

**ALEXANDRE DREFAHL**

**ORGANOGENESE DE *Rosa x hybrida* CV. VEGAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrônomicas.

Orientadora: Francine Lorena Cuquel

Co-Orientadora: Marguerite Quoirin

**CURITIBA**

**2004**

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>4</b>
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	4
2.2 ASPECTOS ECONÔMICOS	5
2.3 PROPAGAÇÃO COMERCIAL	7
2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	8
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
<b>3 CAPÍTULO II – MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE GEMAS AXILARES</b>	<b>12</b>
3.1 INTRODUÇÃO	12
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.2.1 FONTE DE EXPLANTES	16
3.2.2 ASSEPSIA DO MATERIAL VEGETAL	16
3.2.3 EXCISÃO DA GEMA AXILAR	16
3.2.4 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO	16
3.2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMANHO DA GEMA AXILAR NO POTENCIAL DE ESTABELECIMENTO IN VITRO	17
3.2.6 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE PROLIFERAÇÃO	17
3.2.7 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE ENRAIZAMENTO	18
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.3.1 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO	19
3.3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMANHO DA GEMA AXILAR NO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO	21
3.3.3 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE PROLIFERAÇÃO	22
3.3.4 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE ENRAIZAMENTO	23
3.4 CONCLUSÃO	24
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
<b>4 CAPÍTULO III – OBTENÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES ASSÉPTICOS PARA INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE</b>	<b>28</b>
4.1 INTRODUÇÃO	28
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.2.1 SELEÇÃO E PREPARO DE MATRIZES	31
4.2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	31
4.2.3 BROTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS <i>IN VITRO</i>	32
4.2.3.1 Experimento I – Efeito do Etanol e NaClO na desinfestação de segmentos nodais:	32
4.2.3.2 Experimento II - Efeito de diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais:	33

4.2.3.3	Experimento III - Efeito dos 4 melhores tratamentos do Experimento II na desinfestação de segmentos nodais: .....	35
4.2.3.4	Experimento IV – Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais na necrose por infiltração de nitrato de prata: .....	36
4.2.3.5	Experimento V – Efeito do digluconato de clorexidina na desinfestação de segmentos nodais .....	36
4.2.3.6	Experimento VI – Efeito do tratamento com baixa temperatura na porcentagem de oxidação de segmentos nodais .....	37
4.2.4	BROTAÇÃO DE HASTES FLORAIS <i>EX VITRO</i> .....	38
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.3.1	BROTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS <i>IN VITRO</i> .....	40
4.3.1.1	Experimento I – Efeito do Etanol e NaClO na desinfestação de segmentos nodais .....	40
4.3.1.2	Experimento II - Efeito de diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais: .....	42
4.3.1.3	Experimento III - Efeito dos 4 melhores tratamentos do Experimento II na desinfestação de segmentos nodais: .....	46
4.3.1.4	Experimento IV – Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais na necrose por infiltração de nitrato de prata. ....	47
4.3.1.5	Experimento V – Efeito do digluconato de clorexidina na desinfestação de segmentos nodais .....	49
4.3.1.6	Experimento VI – Efeito do tratamento com baixa temperatura na porcentagem de oxidação de segmentos nodais .....	52
4.3.2	BROTAÇÃO DE HASTES FLORAIS <i>EX VITRO</i> .....	54
4.4	CONCLUSÃO .....	56
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
5	<b>CAPÍTULO IV – ORGANOGÊNESE EM TECIDO FOLIAR.....</b>	<b>59</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	59
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
5.2.1	INDUÇÃO DE CALO ORGANOGÊNICO .....	63
5.2.1.1	Experimento I - Efeito da combinação de vários reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares .....	63
5.2.2	ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES .....	63
5.2.2.1	Efeito de dois meios de cultura suplementados ou não com reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares. ....	63
5.2.2.2	Efeito de dois meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento na indução de gemas em calos organogênicos.....	64
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
5.3.1	INDUÇÃO DE CALO ORGANOGÊNICO .....	65
5.3.1.1	Efeito da combinação de vários reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.....	65
5.3.2	ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES .....	69
5.3.2.1	Efeito de dois meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.....	69
5.3.2.2	Efeito de dois meios de cultura suplementados ou não com reguladores de crescimento na indução de gemas em calos organogênicos.....	70

5.4	CONCLUSÃO .....	71
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores da oxidação, sobrevivência, contaminação e do desenvolvimento de folhas em gemas axilares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas em quatro meios de cultura, após 30 dias. ....	19
TABELA 2 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por componentes principais das variáveis analisadas no experimento de desenvolvimento de gemas axilares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas em quatro meios de cultura. ....	20
TABELA 3 - Efeito do tamanho do explante, no potencial de regeneração de gemas laterais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas.....	21
TABELA 4 - Efeito de três combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo MS sobre a proliferação de gemas axilares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas.....	22
TABELA 5 - Número de raízes e comprimento da maior raiz de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas, no experimento de enraizamento de brotações provenientes de cultivo <i>in vitro</i> . ....	23
TABELA 6 - Efeito da desinfestação com Etanol 70% (1 min) e NaClO (5 min) de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas. ....	41
TABELA 7 - Valores de qui-quadrado obtidos para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas. ....	43
TABELA 8 - Efeito dos diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas. ....	43
TABELA 9 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas utilizando 54 diferentes tratamentos. ....	44
TABELA 10 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	46
TABELA 11 - Efeito dos tratamentos à base de $\text{AgNO}_3$ e $\text{CuSO}_4$ sobre as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas.....	47
TABELA 12 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento que avaliou o efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas, na necrose por infiltração de nitrato de prata.....	48
TABELA 13 - Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas submetidos a processo de assepsia a base de $\text{AgNO}_3$ sobre a taxa de necrose.....	48
TABELA 14 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas, tratadas com digluconato de clorexidina.....	50

TABELA 15 - Efeito do digluconato de clorexidina na assepsia, necrose e formação de brotos em segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	50
TABELA 16 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina. ....	51
TABELA 17 - Efeito combinado do tratamento térmico com posterior tratamento com digluconato de clorexidina por 10 min, nas variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	52
TABELA 18 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina e submetidos a tratamento térmico.....	53
TABELA 19 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de brotação de estacas de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas, <i>ex vitro</i> . ....	54
TABELA 20 - Efeito do digluconato de clorexidina sobre a contaminação e necrose, na assepsia de explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	54
TABELA 21 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina. ....	55
TABELA 22 - Descrição das variáveis analisadas no experimento de indução de calos organogênicos em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas submetidos a 5 suplementações de reguladores de crescimento do meio MS. 65	
TABELA 23 - Efeito de dois meios de cultura (MS e SH) sobre a formação de calos em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas. ....	69

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Segmento nodal de 4 cm de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas com uma gema axilar.....	32
FIGURA 2	- Estacas de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas brotadas <i>ex vitro</i> . ....	38
FIGURA 3	- Corte longitudinal realizado em segmento nodal de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas demonstrando a penetração de nitrato de prata nos vasos condutores. ....	47
FIGURA 4	- (A) Corte longitudinal em segmento nodal de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas tratada com AgNO <sub>3</sub> sem corte das extremidades; (B) Corte longitudinal em segmento nodal de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas tratada com AgNO <sub>3</sub> sem corte das extremidades; .....	49
FIGURA 5	- Calo induzido no meio MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	66
FIGURA 6	- Calo induzido no meio MS + 0,2 mg.L <sup>-1</sup> AIA + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> CIN em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	66
FIGURA 7	- Calo induzido no meio MS + 0,01 mg.L <sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	68
FIGURA 8	- Gemas induzidas em calos de explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas cultivados em meio MS + 0,01 mg.L <sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> .....	68
FIGURA 9	- Calo induzido no meio MS + 0,01 mg.L <sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas .....	67
FIGURA 10	- Calos induzidos no meio MS + 0,12 mg.L <sup>-1</sup> AIB + 1,5 mg.L <sup>-1</sup> CIN em explantes foliares de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas. ....	69

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Espécies, cultivares, processos, fontes, tipos de explantes e respostas obtidas na micropropagação de roseiras. ....	13
QUADRO 2 - Índice de correlação entre variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de <i>Rosa x hybrida</i> cv. Vegas utilizando etanol e hipoclorito de sódio. ....	41



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	2-isopenteniladenina
AFMT	Análise Fatorial por Matriz Tetracórica
AIA	Ácido 3-indolacetico
AIB	Ácido indolbutirico
ANA	Ácido naftaleno acético
ANOVA	Análise da variância
BAP	6-benzilaminopurina
CIN	6-furfurilaminopurina (cinetina)
cv.	Cultivar(es)
etOH	Etanol
GA <sub>3</sub>	Ácido Giberélico
MS	Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)
MS $\frac{1}{2}$	Meio MS com a metade da concentração de sais
ns	Não significativo
P	Probabilidade estatística
pH	Potencial de Hidrogênio
PR	Paraná
SH	Meio de cultura de SCHENK e HILDEBRANDT (1996)
sp.	Espécie
TDZ	Tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)uréia)
Tn	Tratamento número “n”
WPM	Meio de cultura “ <i>Woody Plant Medium</i> ” de LLOYD e McCOWN (1981)

## RESUMO

A rosa (*Rosa x hybrida*) é propagada comercialmente por métodos vegetativos. Estes métodos estão frequentemente associados à disseminação de doenças. Além disso, a transformação genética necessita protocolos eficientes para obtenção de material asséptico e para organogênese. Os protocolos desenvolvidos neste trabalho foram focados nestes dois problemas: oferecer um protocolo alternativo para micropropagação a partir de gemas axilares e um protocolo para obtenção de folhas assépticas com posterior organogênese. O cultivar de rosa de corte utilizado foi o Vegas. O melhor resultado para a micropropagação foi obtido com gemas com 5 a 7 primórdios desenvolvidas em meio MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA, multiplicadas em meio MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e enraizadas em meio MS<sup>1/2</sup> sem reguladores de crescimento. Ramos mantidos em condições não assépticas forneceram folhas que sofreram posterior assepsia, produziram melhores resultados do que os métodos *in vitro* aplicando soluções anti-bacterianas e anti-fungicas. O melhor meio para obtenção de organogênese via explantes foliares foi o meio MS suplementado com 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.

Palavras-chave: floricultura, micropropagação, plantas ornamentais.

## ABSTRACT

Rose (*Rosa x hybrida*) is commercially propagated by vegetative methods. These methods are frequently associated with diseases spreading. Besides this, plant transformation protocols need efficient methods for obtaining aseptic material and organogenesis. Protocols developed on this research were focused on these two problems: to offer alternative protocol for micropropagation of axillary buds and a protocol for obtaining aseptic leaves and organogenesis from leaves explants. Rose cut flower cultivar evaluated in this study was 'Vegas'. The best results for micropropagation were obtained with buds size with 5 to 7 primordia developed on MS media supplemented with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0.25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0.01 mg.L<sup>-1</sup> IAA. Multiplication occurred on MS media supplemented with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and rooting on ½MS without growth regulators. Branches maintained under non-aseptic conditions which supplied leaves that suffered posterior disinfection, were better than *in vitro* methods applying anti-fungal and anti-bacterial solutions. The best media for leaves organogenesis was MS supplemented with 0.01 mg.L<sup>-1</sup> NAA + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.

Key-words: floriculture, micropropagation, ornamental plant.

## 1 Introdução

Os mais antigos registros de que se tem notícia da existência da rosa datam de 25 milhões de anos atrás, durante a chamada era terciária, época em que nem os *Australopithecus*, os primeiros autênticos ancestrais do homem, habitavam o planeta. Sabe-se da existência de rosas naquela época por meio da descoberta de fósseis no Japão, China, Bulgária, França, Alemanha, Áustria e Estados Unidos. Mais do que isso, a rosa iniciou o seu importante papel na cultura dos antigos povos asiáticos e do Oriente Médio. Arqueólogos encontraram entre os rios Tigre e Eufrates, nas escavações da antiga cidade da Mesopotâmia, onde foram descobertos os túmulos dos sumérios, antecessores dos babilônios, inscrições dando conta que o rei Sargão teria trazido “do além *Taurus* mudas de rosas, videiras e figueiras”. O rei Sargão viveu de 2.684 a 2.630 a.C., portanto há quase cinco mil anos. Mais tarde, há cerca de mil anos antes de Cristo, Confúcio deixou registrado que na biblioteca do Imperador da China existiam cerca de 600 livros sobre rosas, e que a nobreza chinesa apreciava muito o óleo feito a partir das pétalas desta flor. No Brasil, sabe-se que essas flores foram introduzidas pelos jesuítas, aparentemente entre os anos de 1560 e 1570. São palavras do padre Anchieta na Carta Anua de 1583 referindo-se às solenidades de instituição da Confraria de Nossa Senhora do Rosário na Vila de Piratininga, hoje São Paulo: “A igreja e a escola foram construídas na Vila de Piratininga onde foi plantado em seu pátio um roseiral, de onde provinham as rosas utilizadas nas solenidades religiosas”. Em outro trecho: “Procedeu-se a seguir uma devota procissão ao rogatório, na qual todos traziam à cabeça suas coroas de rosas (...), carregando o padre debaixo do pálio de seda uma imagem da Virgem Mãe, também ela emoldurada de rosas vermelhas”. Mais recentemente na década de sessenta, na gestão do brigadeiro Faria Lima como prefeito de São Paulo, construiu-se no Parque do Ibirapuera, o que pretendia-se fosse o maior roseiral do Brasil. Mais de 6.000 mudas de roseiras foram plantadas. Não obstante, relegadas posteriormente ao abandono, depois de alguns anos o roseiral deu espaço a um lindo gramado (BOETCHER, 1991).

A importância da rosa como planta ornamental foi mantida, sendo esta a flor mais comercializada no mercado nacional de plantas ornamentais e flores de corte. Responde sozinha por 11% do movimento financeiro anual desde mercado (CASTRO, 1998). Estes

valores tendem a aumentar com a crescente produção voltada para a exportação (AKI, 2003<sup>1</sup>).

No Brasil, as rosas são propagadas vegetativamente de duas formas: por estaquia e por enxertia. A enxertia traz um problema que é a dificuldade que se tem para enraizar estacas mesmo com o uso de hormônios. A enxertia é onerosa pelo seu consumo de mão-de-obra. Além de causar um estresse na planta pelo estrangulamento da condução de seiva no ponto do enxerto (BOETCHER, 1991). Ambas são técnicas responsáveis por disseminação de diversos tipos de doenças fúngicas, bacterianas e virais (BERGAMIN, 2000).

Estas dificuldades podem ser superadas com a cultura de tecidos. Com ela é possível se conseguir um grande número de mudas sadias e livres de pragas, num curto espaço de tempo. É uma ferramenta eficiente e importante no melhoramento genético no sentido de propagar novos cultivares. Além de permitir avanços no campo da engenharia genética, onde é fundamental. Sem a cultura de tecidos, a transformação genética se torna inviável. Quando o objetivo é a transformação, deve-se desenvolver um método de regeneração que permita a obtenção de mudas a partir de tecidos vegetais que possam ser transformados. No caso de rosas os tecidos comumente utilizados são folhas e embriões somáticos (HSIA, 1996).

A contribuição deste trabalho consiste em estabelecer um protocolo de micropropagação via gemas axilares para a produção de uma grande quantidade de mudas sadias de *Rosa x hybrida* cultivar Vegas, um cultivar de boas características culturais e boa aceitação no mercado. Assim como desenvolver um protocolo de organogênese via explantes foliares, técnica útil no melhoramento e engenharia genética. Para que estes objetivos fossem alcançados, alguns objetivos específicos foram estabelecidos:

- a. Desenvolver um protocolo de micropropagação via gemas axilares;
  - a<sub>1</sub>. Verificar qual o meio de cultivo mais adequado para o desenvolvimento inicial das gemas axilares;
  - a<sub>2</sub>. Definir qual o meio de cultivo mais eficiente para a proliferação de gemas no material cultivado;
  - a<sub>3</sub>. Estabelecer um processo eficiente para o enraizamento das plântulas obtidas.

---

<sup>1</sup> AKI, Augusto, Flower Business Consultoria, Informação pessoal, 2003

- b. Desenvolver um protocolo de assepsia de explantes foliares para indução de organogênese
- c. Desenvolver um protocolo de organogênese indireta em tecido foliar;
  - c<sub>1</sub>. Verificar qual o meio de cultivo mais adequado para indução de calos organogênicos;
  - c<sub>2</sub>. Verificar qual o meio de cultivo mais eficiente para produção de gemas adventícias nos calos formados na etapa anterior.

## 2 Capítulo I – Introdução Geral

### 2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

Segundo LORENZI (1999), *Rosa x hybrida* é uma espécie da família *Rosaceae* também conhecida pelos seus nomes populares que são: roseira híbrida, roseira, rosa ou rosa arbustiva. Este grupo de roseiras híbridas perpétuas é proveniente do cruzamento e seleção das roseiras “floribundas” (*Rosa polyantha* sin. *Rosa multiflora*) com as “híbridas de chá” (*Rosa borboniana*) (TITCHMARSH, 1990). É a principal e a mais antiga fornecedora de flores de corte em uso comercial no país. Desenvolve-se melhor e floresce mais intensamente em climas de temperatura amena, como no sul do país ou em regiões de altitude dos sub-trópicos (LORENZI, 1999).

As rosas, devido à hibridação, atingiram diversos estratos ou tamanhos, tais como: rasteiras, arbustivas e trepadeiras. Inúmeras cores, odores e até ausência de espinhos foram obtidos. Por ser extremamente versátil no paisagismo, pode ser trabalhada de forma horizontal e verticalmente. As rosas rasteiras podem ser usadas como forração em canteiros formais ou informais (irregulares), em uma ou diversas cores (BIONDI, 2003).

Existem atualmente mais de 20.000 cultivares de rosa catalogados (LAURIE, 1998). O cultivar que foi utilizado nesta pesquisa foi o Vegas, de boas características fitotécnicas e boa aceitação no mercado. Um arbusto que cresce bastante, atingindo 1,5 m de altura. Floresce quase continuamente, produzindo grande quantidade de flores semidobradas, com 10 a 12 pétalas. Os botões medem de 4 a 5 cm e apresentam tons de vermelho tendendo a bordô (ENCICLOPÉDIA DE PLANTAS E FLORES, 1987).

Em alguns estudos a luz tem se mostrado benéfica no incremento tanto na produtividade quanto na qualidade das flores durante o inverno (LAURIE, 1998). Embora a duração do dia aparentemente tenha uma pequena influência no florescimento, a intensidade de luz afeta diretamente o crescimento e produtividade. A temperatura de crescimento também tem uma profunda influência na qualidade e na época de florescimento. Ainda que temperaturas abaixo dos 13,2°C geralmente reduzam a produtividade das plantas, incrementam a qualidade das flores. Em contraste, temperaturas

acima de 18,2°C tem o efeito inverso, afetando a qualidade das flores, porém aumentando a produtividade e o florescimento (SHAW, 1992).

## 2.2 ASPECTOS ECONÔMICOS

Sem estatísticas oficiais sobre a produção de plantas ornamentais no Brasil, o Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLO) explica que é difícil agregar a produção dessas mercadorias num único volume, pois a produção é medida em função de diversos critérios, conforme a planta ou a flor. Como valor de mercado, diversas fontes apontam que o valor global da produção brasileira de plantas ornamentais está em torno de R\$ 2 bilhões ao ano (SALIGNAC, 2003). Dentro deste mercado, a rosa é a flor de corte mais importante e ocupa a primeira posição no *ranking* nacional de vendas (CASTRO, 1998). A rosa é responsável por aproximadamente 11% do montante movimentado pela floricultura nacional, ou seja 216 milhões de reais gerados pelo movimento de 30 milhões de dúzias comercializadas anualmente. (AKI, 2003<sup>2</sup>). O brasileiro ainda consome poucas flores e plantas ornamentais (US\$ 7 por pessoa por ano) se comparado a habitantes de países da Europa como a Suíça (US\$ 180) e mesmo da América Latina como a Argentina (US\$ 25) (BRASILTRADENET, 2003).

O Brasil tem cerca de 5.000 produtores de plantas ornamentais e mais de 25.000 hectares de área plantada e o setor continua crescendo. O crescimento médio na última década foi de 20% ao ano. A produção nacional de rosas concentra-se principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Ceará. A produção paulista é responsável por 70% da produção nacional e é toda absorvida pelo seu grande mercado distribuidor e consumidor. Já a cearense tem outro foco: a exportação. O Ceará vem se destacando como pólo produtor nos últimos anos. Muitos investidores brasileiros e estrangeiros, principalmente equatorianos, estão comprando terras no Ceará. As principais vantagens são a localização geográfica do Ceará – há cerca de seis horas de avião tanto da Europa, quanto do sul dos Estados Unidos – o que facilita a exportação; e o novo aeroporto de Fortaleza, que está aparelhado para o embarque de produtos perecíveis (BRASILTRADENET, 2003). Além disso, o governo do Ceará incentiva a produção e exportação de flores por meio do projeto Agroflores. Com isso os produtores deste estado, além de vender para o mercado interno, já exportam para Holanda, Alemanha e Estados

---

<sup>2</sup> AKI, Augusto, Flower Business Consultoria, informação pessoal, 2003.



Unidos (BONGERS, 2000). De acordo com o IBRAFLO, o Brasil tem potencial para se tornar um dos maiores produtores e exportadores do mundo, devido a sua diversidade climática e abundância de terras produtivas. Embora ainda tenha menos de 5% de sua produção voltada para este fim (PIZANO, 2003).

O país se encontra atualmente em 20º lugar nas exportações de plantas ornamentais e flores de corte. O Brasil exportou em 2002, 16 milhões de dólares. Isto representa um crescimento de 27,7% em relação a 2001, quando foram exportados 11,7 milhões de dólares. Mas ainda assim, foi 25 vezes menos que a Colômbia, que movimentou de 400 a 500 milhões de dólares no mesmo período (RISCH, 2003). A meta brasileira é aumentar as exportações para 80 milhões em 2004. Em 1999 o Brasil exportou 19 mil dúzias de rosas e 38 mil no ano seguinte. Destes valores, cerca de 5% se destinaram ao mercado Norte Americano. Os outros 95% distribuíram-se da seguinte forma: 75% para Argentina e 20% para Portugal. Tendo em vista o baixo percentual de exportação, a conquista do mercado Norte Americano é um dos objetivos do país. Para o produtor brasileiro, o período de alta demanda nos Estados Unidos é estratégico. Pois ocorre de dezembro a fevereiro, época em que no mercado nacional há carência de demanda. Prova de que o nicho existe é a diminuição da produção americana em pequenas propriedades (52% em 1991 para 15% em 2001). O motivo é que não conseguem competir em preço e qualidade com as rosas vindas do México e América Latina, que garantem atualmente mais da metade das rosas cortadas vendidas nos Estados Unidos (MENEHINI, 2003).

Para garantir este nicho do mercado, representado pelas exportações, foi lançado o Programa FloraBrasilis. Implantado em janeiro de 2001 por meio de um convênio entre o IBRAFLO e a Agência de Promoção de Exportação (APEX). O programa tem por objetivo reunir produtores de todo o País, criar uma marca brasileira e conquistar os mercados externos. Parte da estratégia é aumentar a presença do Brasil nas grandes feiras internacionais do setor, como a de Aalsmeer, na Holanda, ou o Superfloral Show, em Charlotte, nos Estados Unidos (NOGUEIRA, 2000, SALIGNAC, 2003).

O crescimento das exportações surtirá efeito na geração de empregos. Trata-se de um mercado de uso intensivo de mão-de-obra em toda a cadeia, desde a produção até a distribuição e comercialização (NOGUEIRA, 2000). Também por isso, a exportação de flores começa a se desenvolver no Nordeste. Com a predominância de mão-de-obra familiar, a produção de flores contribui para fixar o homem ao campo e estancar o fluxo migratório na região; promove a produção agrícola por pequenos e médios produtores, fornecendo

produtos com alto valor de mercado. O que aumenta a renda *per capita* regional e a geração de renda indireta (CASTRO, 1998).

## 2.3 PROPAGAÇÃO COMERCIAL

A propagação comercial de rosa é feita principalmente por meio de estaquia e enxertia. O primeiro é o método mais fácil, porém não apresenta bons resultados pelo fato da grande maioria das rosas híbridas não se desenvolverem sobre suas próprias raízes. Outro problema é que o desenvolvimento das raízes é bastante lento, mesmo com a aplicação de hormônios enraizadores. Na verdade, somente roseiras silvestres, ou espécies de ascendência próxima a estas, produzem resultados eficientes por esta técnica. Mesmo assim, a multiplicação por estacas é feita em grande escala, para a produção de porta-enxertos ou “cavalos”. *Rosa multiflora*, *Rosa indica* e *Rosa maneti*, produzidas por estaquia, são os porta-enxertos mais usados no Brasil. O segundo método, enxertia, é o mais utilizado comercialmente. É o processo mais recomendável para propagação comercial; entretanto, este processo é oneroso por consumir grande quantidade de mão-de-obra (BOETTCHER, 1991). Não só financeira é a desvantagem do método, pois o ponto de cicatrização do enxerto é um local de penetração de microorganismos. Além de provocar um estrangulamento na condução de seiva devido à desorganização dos vasos condutores na região cicatrizada (HARTMANN et al., 2002).

Ambos os métodos de propagação explicam a grande disseminação de doenças e pragas. As doenças mais comumente encontradas em rosas são de origem bacteriana e fúngica como o mofo-branco, a mancha-preta e o míldio. São difundidas principalmente por meio de mudas contaminadas providas da propagação convencional (BERGAMIN, 2000).

Um dos métodos para se evitar a transmissão de doenças na propagação de plantas é a utilização de técnicas de micropropagação a partir de meristemas, tanto para obtenção de matrizes sadias quanto para a produção de mudas. Além deste aspecto pode se destacar a grande importância da micropropagação por ser um método que mantém as mesmas características da planta matriz, permitindo a clonagem de genótipos selecionados, de alta qualidade genética. Outro ponto importante é a homogeneidade apresentada pelas plantas obtidas por este método, que é importante para a padronização do ponto de colheita e dos tratos culturais. Com pouca quantidade de plantas matrizes pode-se produzir uma grande quantidade de mudas em pouco tempo. Há também a possibilidade de produção e

conservação de grande número de plantas em espaço reduzido, com baixa exigência de mão-de-obra para sua manutenção. As mudas micropropagadas têm a vantagem de ser mais facilmente comercializadas, pois se forem vendidas em raiz nua, não há necessidade de substrato e o volume da embalagem se torna menor. A característica mais interessante é que permite planejar a produção de acordo com a demanda de mudas (HARTMANN et al., 2002, BOETCHER, 1991).

## 2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

O mercado de flores é muito dinâmico, pois o consumidor é ávido por novidades. Para isso é necessário que o melhoramento das espécies seja também dinâmico buscando novas cores de flores, novas arquiteturas de planta, novos aromas, enfim características que diferenciem o produto. Um dos problemas do desenvolvimento de novos genótipos tem sido o limitado *pool* gênico, ou seja a quantidade de genes disponíveis para cada espécie. A transferência de genes de espécies selvagens para cultivadas é limitada pela incompatibilidade sexual presente em muitas espécies. Na transformação genética este limite não existe sendo possível inclusive a transferência de genes entre organismos de reinos diferentes. Outro problema das metodologias convencionais de melhoramento é a ligação gênica. A transferência de genes desejáveis, por meio de práticas convencionais de melhoramento de plantas, implica a transferência e a recombinação de todo o genoma. Portanto a introdução de um gene desejável pode ser acompanhada de outros genes não desejáveis, ou até mesmo deletérios, sendo eles co-herdados com alta frequência. Neste caso, a vantagem de se utilizar a transformação genética está no fato de ser possível transferir um só gene que confira a característica desejável a um cultivar, eliminando assim o efeito de ligação gênica percebido nos cruzamentos (BRASILEIRO, 1998).

Apesar da existência de uma grande variedade de técnicas de transformação, ainda não existe um sistema único de transferência de genes, que possa ser considerado universal, e ser usado em qualquer espécie vegetal. O sistema de transformação via *Agrobacterium sp.* foi usado para transformar uma grande variedade de espécies vegetais. O motivo de ser o sistema mais usado está na sua alta eficiência de transformação assim como na simplicidade dos protocolos de seleção (BRASILEIRO 1998). Entretanto, a maior dificuldade para obtenção de plantas transformadas, ainda é o estabelecimento prévio de um sistema de regeneração eficiente. Este sistema está diretamente ligado à escolha do explante. Em rosas, os explantes mais utilizados com este objetivo são as folhas e os

embriões somáticos (KORBAN, 2003). Meristemas também foram transformados com sucesso em outras rosáceas como o morango (JAIN, 1992). A dificuldade existente na regeneração do explante transformado reside em que cada espécie vegetal tem necessidades hormonais e nutricionais diferentes para sua regeneração (DUSI, 1998). Durante o desenvolvimento dos protocolos geralmente são encontradas algumas dificuldades. Nas rosas, por exemplo, existem dificuldades como multiplicação das células das brotações, indução de raízes e aclimação da plântula micropropagada (PIERIK, 1995; TASLIM, 1995).

Alguns casos de sucesso de transformação genética em rosas de outros cultivares foram reportados. A exemplo, KORBAN (2003) desenvolveu protocolo para inserção de genes de resistência a *Sphaerotheca pannosa* e *Botritis cinerae* (mofo cinzento) em *Rosa x hybrida* cv. Carefree. O autor justifica a sua pesquisa relatando que o melhoramento conseguiu conferir às roseiras resistência às pragas, porém criou um indesejável nível de heterozigose no genoma. No protocolo o autor induz a embriogênese somática em tecido foliar de roseiras e co-cultiva os embriões com *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. As plantas obtidas quando estes embriões germinaram, eram transformadas e resistentes. MARCHANT et al. (1998) obtiveram embriões somáticos transformados via biobalística. Estes autores introduziram o gene da quitinase em *Rosa x hybrida* cv. Glad Tiding obtendo uma redução do aparecimento de mancha negra (*Black spot*) de 13 a 43%. Por outro lado, DERKS et al. (1995) obtiveram embriões transgênicos de rosa cv. Moneyway, porém nunca conseguiram a conversão em planta.

A resistência a doenças e pragas é apenas um dos objetivos que se pode almejar com a engenharia genética em flores. Outras possibilidades são também factíveis com a técnica. Por exemplo, transformação para mudança de coloração por meio de mudança de rotas metabólicas. Mudança de arquitetura da planta, alteração na morfologia floral, produção de metabólitos secundários e resistência a diversos tipos de estresse – salino, hídrico, térmico, nutricional, etc. – são outras possibilidades. Podendo valer-se de genes de outras espécies existe um grande leque de opções para pesquisa (TORRES, 1998).

À medida que novos genes venham sendo isolados, caracterizados e que se tornem disponíveis para testes em transformação genética, haverá uma demanda cada vez maior das técnicas de cultura de tecidos.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGAMIN, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, São Paulo: Editora Agronômica CERES, v.1, 1995.
- BIONDI, D. **Engenharia Florestal – UFPR, As Rosas no Paisagismo**. Disponível em: <[http://www.floresta.ufpr.br/~paisagem/plantas/as\\_rosas\\_no\\_paisagismo1.htm](http://www.floresta.ufpr.br/~paisagem/plantas/as_rosas_no_paisagismo1.htm)>, 2003. Acessado em 09 de janeiro de 2004.
- BOETCHER, A. **Rosas: Tudo sobre a rainha das flores**, São Paulo, Ed. Europa, p. 76-81, 1991.
- BONGERS, F. In. NOGUEIRA, S. P. **Pétalas brasileiras**. REVISTA UPDATE: Exportação, n. 363, p. 10-13, 2000.
- BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética de plantas In. TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, v.2, p. 679-717, 1998.
- BRASILTRADENET. Brazil: Economic Prospects, **Trade/Business News**. Disponível em: <<http://www.buybrazil.org/secom/secomkl4.html>>, 2003. Acessado em: 09 de janeiro de 2004.
- CASTRO, C.E.F.C. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 4, n. 1/2, p.1-46, 1998.
- DERKS, F. H. M.; VAN DIJK A. J.; HÄNISCH TEN CATE C. H.; FLORACK D. E. A.; DUBOIS L. A. M.; VRIES D. P. Prolongation of vase life of cut roses via introduction of genes coding for antibacterial activity, somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation, **Acta Horticulture**. n. 405, p. 205–209, 1995.
- DUSI, D.M.A. In. TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, v.2, p. 679-717, 1998.
- ENCICLOPÉDIA DE PLANTAS E FLORES**. São Paulo – Brasil, ed: Abril Cultural, 1987, 2ª Edição, vol. 3, págs: 135-139.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. 7.ed. **Plant Propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall. 2002. 880p.
- HSIA, C.N. ;KORBAN, S.S., Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.44, p.1-6, 1996.
- JAIN, S. M.; PEHU, E. The prospects of tissue culture and genetic engineering for strawberry improvement. **Acta Agriculturae Scandinavica**, n. 3, p. 133-139, 1992.

- KORBAN S. S. Production of transgenic ornamental plants. **Anais: I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, Universidade Federal de Lavras, 5-9 de outubro, Brasil, p. 15-18, 2003.
- LAURIE A.; KIPLINGER D.C., NELSON K.S. **Commercial flowers forcing**. Nova York, Ed: McGraw-Hill Book, 1998.
- LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2ª edição, pág: 946, 1999.
- MARCHANT, R.; DAVEY M. R.; LUCAS, J. A.; LAMB C. J., DIXON R. A. Power, Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L) reduces development of black spot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf), **Molecular Breeding**, n. 4, p. 187–194, 1998.
- MENEHINI, B. Floraculture International, **An uphill battle**. Disponível em: <<http://www.floracultureintl.com/archive/display.asp?ArticleID=664>>, 2003. Acessado em: 09 de janeiro de 2004.
- NOGUEIRA, S. P. Pétalas brasileiras. **Revista Update: Exportação**, n. 363, p. 10-13, 2000.
- PIERIK, R. L. M., Factors controlling adventitious root formation on stem explants of rose (*Rosa hybrida* cv. 'Motrea') *in vitro*, **Revista Chapingo Serie Horticultura**, n.1, p.23-29, 1995.
- PIZANO, M. Floraculture International, **Brazil, Revisted**, Disponível em: <<http://www.floracultureintl.com/display.asp?ArticleID=769>>, 2003 Acessado em: 09 de janeiro de 2004.
- RISCH, O. A. Engenharia Florestal – UFPR, **O Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais no Brasil e no Mundo**. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br/~paisagem/plantas/mercado.htm>>, 2003. Acessado em: 09 de janeiro de 2004.
- SALIGNAC, C. Panorama Rural on Line, **Flores brasileiras conquistam países da Europa e os Estados Unidos**. Disponível em: <[http://www.panrural.com.br/ver\\_noticia.asp?news\\_id=76](http://www.panrural.com.br/ver_noticia.asp?news_id=76)> 2003. Acessado em: 09 de janeiro de 2004.
- SHAW, R.J.; ROGERS,M.N. Interactions between elevated carbon dioxide levels and greenhouse temperatures on the growth of roses, chrysanthemum, geranium, snapdragons, and African violets. **Flor Rev**, n. 88, p. 23, 1992.
- TASLIM, A. Micropropagation of rose - a review, **Agricultural Reviews Karnal**, n.16 p. 211-218, 1995.
- TITCHMARSH, A. **A-Z of popular garden plants**. Londres - Inglaterra: ed.: Octopus Books Limited, 2ª edição, p. 189-195. 1990.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Ed. Embrapa –SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 1998

### 3 CAPÍTULO II – Micropropagação a Partir de Gemas Axilares

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A cultura de meristemas retirados de gemas axilares é utilizada na propagação *in vitro*, para a obtenção de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma (TORRES, 1998). Gemas axilares também podem ser utilizados como explantes para transformação genética (JAIN, 1992). Uma das vantagens deste sistema é a manutenção da identidade genética do material regenerado, pois as células dos meristemas mantêm mais uniformemente a sua estabilidade genética (TORRES, 1998).

A primeira publicação que cita a multiplicação e o enraizamento de roseiras (*Rosa multiflora*) por meio da cultura de meristemas foi a de ELLIOTT (1970). Posteriormente, ZIESLIN e HALEVY (1976) descreveram a influência da citocinina no aumento da porcentagem de quebra de dormência de gemas em rosas. ROUT et al. (1989a) descobriram que não só a quebra de dormência, mas também, a proliferação de gemas *in vitro* está baseada em meios suplementados com citocininas, muito mais do que auxinas (ROUT et al. 1989a). HASEGAWA (1979) e SKIRVIN e CHU (1979) desenvolveram um método rápido para a multiplicação e indução de raízes em alguns cultivares de *Rosa x hybrida*. BRESSAN et al. (1982) relatam que existem diferenças significativas na taxa de multiplicação de gemas retiradas de diversas porções da haste floral. As gemas próximas ao botão floral e próximas à base se desenvolvem em uma velocidade menor do que as gemas da porção intermediária. Este mesmo autor obteve a melhor taxa de promoção de quebra de dormência de gemas em seu experimento, usando 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP do que com 2iP na mesma concentração, e complementa que o AIA não afetou positivamente nem negativamente.

Desde então muitos trabalhos vêm sendo realizados com a cultura de meristemas de *Rosa x hybrida* (QUADRO 1), dentre eles podem ser citados: KIRICHENKO (1991) que trabalhou com 4 cultivares (Helmut Schmidt, Esmeralda, Sonya e Tornado) de 2 espécies de rosa isoladas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem suplementação e conseguiu bons resultados para os 4 cultivares testados.

QUADRO 1 - Espécies, cultivares, processos, fontes, tipos de explantes e respostas obtidas na micropropagação de roseiras.

AUTOR	ESPÉCIE	CULTIVAR	EXPLANTE	RESULTADO
ELLIOT (1970)	<i>Rosa multiflora</i>		GAp	Multiplicação de gemas
GRAIFENBERG et al. (1975)	<i>Rosa multiflora</i>		MA	Multiplicação de gemas
SKIRVIN e CHU (1979)	<i>Rosa x hybrida</i>	Forever Yours	MA	Multiplicação, desenvolvimento e enraizamento de gemas.
DAVIES (1980)	<i>Rosa x hybrida</i>	CINg's Ransom, Plentiful, Parade e Fragrant	MAx	Multiplicação e enraizamento
HASEGAWA (1980)	<i>Rosa x hybrida</i>	Improved Braze	MA	Multiplicação e enraizamento
KHOSH-KHUI e SINK (1982a)	<i>Rosa x hybrida</i>	Tropicana e Bridal Pink	MA, MAx	Multiplicação e enraizamento
KHOSH-KHUI e SINK (1982b)	<i>Rosa x hybrida</i>	Tropicana e Bridal Pink	MA	Multiplicação e enraizamento
BRESSAN et al. (1982)	<i>Rosa x hybrida</i>	Improved Blaze	MA	Multiplicação
HYNDMAN et al. (1982)	<i>Rosa x hybrida</i>	Improved Blaze	MA	Enraizamento
BARVE et al. (1984)	<i>Rosa x hybrida</i>	Crimson Glory Glenfiditch	MAx	Multiplicação e enraizamento
SAUER et al. (1985)	<i>Rosa x hybrida</i>		GA	Multiplicação e enraizamento
MEDEROS e ENRIGUEZ (1987)	<i>Rosa x hybrida</i>	Gonden Times	MA	Multiplicação e enraizamento
ROUT et al. (1989a,b)	<i>Rosa x hybrida</i>	Queen Elizabeth Landora	MAx	Multiplicação e enraizamento
DOUGLAS et al. (1989)	<i>Rosa x hybrida</i>	Queen Elizabeth	GAp	Multiplicação e enraizamento
ROUT et al. (1990)	<i>Rosa x hybrida</i>	Landora, Virgo Sea Pearl Super Star Happiness Queen Elizabeth	MAx	Multiplicação e enraizamento
CHU et al. (1993)	<i>Rosa chinensis</i>	Minima	MA	Multiplicação e enraizamento
VOYIATZI et al. (1995)	<i>Rosa x hybrida</i>	Dr. Verhage	GAp, MAx	Multiplicação e enraizamento
MARCELIS-VAN ACKER e SCHOLTEN (1995)	<i>Rosa x hybrida</i>	Sweet Promise Motrea	MAx	Multiplicação e enraizamento
YAN et al. (1996)	<i>Rosa rugosa</i> <i>Rosa wichuraina</i> <i>Rosa laevigata</i> <i>Rosa banksiae</i> <i>Rosa roxburghii</i> <i>Rosa odorata</i>		MA, GA	Multiplicação e enraizamento
ARA et al. (1997)	<i>Rosa x hybrida</i>	Peacei	MA, MAx	Multiplicação e enraizamento

MA = Meristema Apical, GAp = Gema Apical, MAx = Meristema Axilar, GA = Gema Axilar

VARDJA e VARDJA (1995), trabalhando com o cultivar Victory Parade desenvolveram um protocolo onde a cultura foi iniciada com MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,001 mg.L<sup>-1</sup> AIB e 5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. Na fase de alongamento, as gemas foram transferidas para meio MS½ suplementado com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> CIN, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> AIA e 5 mg.L<sup>-1</sup>



de ácido ascórbico. O melhor resultado para a fase de enraizamento foi obtido com o meio WPM suplementado com  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA.

No campo da transformação genética, obtiveram-se vários sucessos na transformação de meristemas. A exemplo, GOLDMAN et al. (2003) usaram a técnica de bombardeamento de partículas em meristemas apicais de *Pennisetum glaucum* L. e conseguiram regenerar plantas transgênicas com sucesso. Da mesma forma que SAIRAM et al. (2003), concluíram que o meristema apical é o melhor explante para transformação genética do milho (*Zea mays* L.). PARK et al. (2002) regenerou plantas de alho (*Allium sativum* L) provenientes de meristemas transformados. Avanços também foram feitos com outras espécies da família rosaceae, como em maçã (*Malus domestica*) porta-enxerto M26, onde WELANDER (1998) obteve plantas a partir de meristemas transformados com o gene *ROLb* que influencia no enraizamento. Trabalhos como estes indicam o potencial que os meristemas têm como explantes para a transformação genética.

O objetivo desta etapa é desenvolver um protocolo eficiente para a micropropagação de *Rosa x hybrida* cv. Vegas a partir de gemas axilares. Para isto foram realizados experimentos testando meios de desenvolvimento, multiplicação de gemas e enraizamento.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos desta etapa foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR.

O protocolo de regeneração de *Rosa x hybrida in vitro* apresentado a seguir foi testado para o cultivar comercial Vegas. A cada fase de desenvolvimento, a pesquisa foi conduzida a partir do tratamento que apresentou resultados estaticamente superiores na etapa anterior e os demais tratamentos foram descartados.

Os meios de cultura testados para estabelecimento dos processos básicos da organogênese via gema axilar, foram: MS (Murashige e Skoog, 1962), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, com pH ajustado para 5,8 antes da colocação do agente geleificante, e o meio de PIERIK (1976), suplementado com as vitaminas de MS, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, com pH ajustado para 5,8 antes da colocação do agente geleificante.

Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo cada um 10 mL de meio de cultura e então autoclavados durante 20 minutos a 1,05 kg.cm<sup>-2</sup> de pressão e 121°C. Os tubos foram fechados com tampas plásticas próprias para este fim. Os compostos sensíveis à alta temperatura, como GA<sub>3</sub> e AIA, foram esterelizados por filtração e adicionados após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar.

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram realizados em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes de irradiância de 40 W.m<sup>-2</sup>, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 25 ± 2 °C.

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa StatGraphics® 5.0. As técnicas utilizadas foram, ANOVA acompanhada do teste de Tukey, ou teste de qui-quadrado acompanhado do método multivariado de análise fatorial por componentes principais (variáveis contínuas), ou por matriz tetracórica (variáveis binárias) conforme necessidade. No caso da ANOVA, foi realizado um teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variância.

### 3.2.1 FONTE DE EXPLANTES

Como fonte de explantes, foram utilizadas hastes florais comerciais classificadas como longa (60 cm de comprimento), as quais provinham de um produtor localizado no município de Andradas, Minas Gerais. Estas hastes foram submetidas ao tratamento de assepsia para serem utilizadas na extração das gemas axilares.

### 3.2.2 ASSEPSIA DO MATERIAL VEGETAL

As hastes de rosa foram cortadas em estacas com cerca de 5 cm de comprimento, preferindo-se utilizar os segmentos obtidos da porção mediana da haste, onde as gemas têm o melhor tamanho para manipulação.

As estacas de onde foram retiradas as gemas laterais foram desinfestadas superficialmente com digluconato de clorexidina a 0,5% (v/v) durante 10 minutos e, em seguida, foram enxaguadas três vezes em água estéril.

### 3.2.3 EXCISÃO DA GEMA AXILAR

Em câmara de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica binocular, retiraram-se as escamas e os primórdios foliares que envolvem o meristema da gema axilar. Esta operação foi feita com auxílio de pinças histológicas e bisturi. Com o bisturi extraiu-se a gema axilar, cortando-a na base e em seguida colocando-a em tubo de ensaio com meio de cultura.

### 3.2.4 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO

Esta fase teve por objetivo promover o início do desenvolvimento do meristema retirado das gemas axilares. Para isto foram testados quatro meios de cultura:

- T0 – MS
- T1 - MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA
- T2 - MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA
- T3 - PIERIK + 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 10 repetições e 10 explantes por parcela. Trinta dias após a implantação, cada experimento foi avaliado pelos seguintes parâmetros: porcentagem de sobrevivência, porcentagem de explantes oxidados e número de folhas expandidas.

### 3.2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMANHO DA GEMA AXILAR NO POTENCIAL DE ESTABELECIMENTO IN VITRO.

Instalou-se um experimento com o objetivo de determinar a influência do tamanho do explante isolado em função da capacidade de regeneração. Os tratamentos foram:

- Meristemas com 2 a 4 primórdios
- Meristemas com 5 a 7 primórdios

Os meristemas foram inoculados no meio MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA e incubados em sala de crescimento por 30 dias. O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 10 repetições e 10 tubos por parcela. Foram avaliados: porcentagem de sobrevivência, porcentagem de explantes oxidados e número de folhas expandidas.

### 3.2.6 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE PROLIFERAÇÃO

Este experimento foi realizado com o objetivo de promover o aumento do número de gemas por explante. Com este fim, testou-se os seguintes meios de cultura:

- T1 - MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>
- T2 - MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>
- T3 - MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 40 repetições por tratamento. A avaliação foi feita 45 dias após a implantação do experimento pelas seguintes variáveis: número de gemas formadas por explante e número de folhas expandidas por brotação.

### 3.2.7 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE ENRAIZAMENTO

As brotações com cerca de 1 a 1,5 cm provenientes do melhor tratamento do experimento anterior (T1) foram transferidas para 3 meios de cultura conforme apresentado a seguir:

- T1 - MS  $\frac{1}{2}$
- T2 - MS
- T3 - MS + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> AIB

Depois de transferidas para os meios de cultura de enraizamento, os brotos foram incubadas em câmara de crescimento por 30 dias quando então foram avaliadas quanto ao número médio de raízes emitidas por explante, o comprimento da maior raiz de cada explante e a porcentagem de explantes enraizados.

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 15 repetições por tratamento.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE DESENVOLVIMENTO

A ANOVA da porcentagem de oxidação demonstra que houve diferenças significativas entre os tratamentos, com o destaque de dois tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si (TABELA 1), T2 e T1. Estes tratamentos apresentaram baixas taxas de oxidação.

TABELA 1 - Valores da oxidação, sobrevivência, contaminação e do desenvolvimento de folhas em gemas axilares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas em quatro meios de cultura, após 30 dias.

Tratamento	BAP	GA <sub>3</sub>	AIA	Necrose (%)		Sobrevivência (%)		Contaminação (%)		Nº Folhas/gema	
	(mg.L <sup>-1</sup> )										
T0	---	---	---	35	a	51	c	2	ns	0,00	d
T1	0,5	0,1	0,01	16	b	81	a	2	ns	1,82	b
T2	0,5	0,25	0,01	5	b	92	a	3	ns	3,09	a
T3	2,0	---	---	33	a	66	b	3	ns	0,58	c

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 99% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação à porcentagem de sobrevivência, a ANOVA também mostrou diferenças estatisticamente significativas. Destacaram-se dos demais os tratamentos T2 e T1 que não diferiram estatisticamente entre si. As taxas de sobrevivência atingidas por estes tratamentos foram respectivamente 92 e 81%. Estes dados indicam que estes dois tratamentos foram superiores estatisticamente aos demais, sendo adequados para obtenção de explantes para os próximos experimentos. Este resultado era esperado, pois ROUT (1990) conseguiu desenvolver meristemas de *Rosa x hybrida* cv. Landora, utilizando o meio T1 e o meio T2. Em 2 meses o autor possuía plântulas com pelo menos uma folha expandida. O meio de PIERIK (1976) também respondeu de acordo com o esperado, pois TOMBOLATO (1998) utilizando este meio, obteve o desenvolvimento de gemas axilares de *Rosa x hybrida* porta-enxerto cv. Shafter. BRESSANT et al. (1982), trabalhando com *Rosa x*

*hybrida* cv. Gold Glow, observaram que BAP em baixas concentrações estimula o desenvolvimento de gemas de *Rosa x hybrida*.

Analisando a porcentagem de contaminação verifica-se que a taxa foi baixa e que não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos aplicados.

Para a variável número de folhas expandidas, o T2 destaca-se estatisticamente dos demais tratamentos, com uma média de aproximadamente 3 folhas expandidas por explante após 30 dias. A fim de refinar a escolha do melhor tratamento, realizou-se uma análise fatorial por componentes principais. O resultado desta análise pode ser visto na TABELA 2 abaixo.

TABELA 2 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por componentes principais das variáveis analisadas no experimento de desenvolvimento de gemas axilares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas em quatro meios de cultura.

Tratamento	Escore Fatorial	Ranking
T2 - MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> + 0,01 mg.L <sup>-1</sup> AIA	2,5483	1
T1 - MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> + 0,01 mg.L <sup>-1</sup> AIA	0,8775	2
T3 - PIERIK + 2 mg.L <sup>-1</sup> BAP	-1,2481	3
T0 - MS	-2,1777	4

Com base na análise fatorial podemos concluir que apesar dos tratamentos T2 e T1 serem estatisticamente iguais, o tratamento T2 é superior em eficiência. Esta conclusão é obtida analisando todas as variáveis medidas na avaliação.

Neste experimento pôde ser verificado por observações que as gemas retiradas, que ficavam com 2 a 4 primórdios, oxidavam mais facilmente ou não regeneravam. Já as gemas retiradas com 5 a 7 primórdios tiveram um índice de brotamento superior. Para que não restasse dúvida quanto à influência do tamanho do explante retirado no potencial de regeneração, instalou-se um experimento onde foram retiradas gemas de ambos tamanhos.

### 3.3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMANHO DA GEMA AXILAR NO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO

A ANOVA (TABELA 3) demonstrou que existiu diferença estatística entre as respostas dos tratamentos. O explante com 5 a 7 primórdios tem maior potencial de regeneração em relação ao explante com 2 a 4 primórdios. Isto foi provado pela superioridade estatística demonstrada pelo teste de Tukey a 99% de probabilidade do tratamento com gemas maiores. Esta superioridade pode ser observada para todas as variáveis analisadas (TABELA 3).

TABELA 3 - Efeito do tamanho do explante, no potencial de regeneração de gemas laterais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

Tratamento	Necrose(%)		Sobrevivência(%)		Contaminação(%)		Nº Folhas	
Pequeno (2 a 4)	28,0	a	48,0	b	0,1	ns	0,7	b
Grande (5 a 7)	5,0	b	95,0	a	0,0	ns	2,9	a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 99% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como o tratamento com gemas grandes apresentou superioridade em todas as variáveis, não há a necessidade de uma análise fatorial para comprovar que este é o melhor tratamento. Este fato confirma as observações de ARA (1997) e KHOSH-KHUI (1982b) segundo as quais o tamanho do explante desempenha papel fundamental no desenvolvimento e multiplicação a partir de gemas axilares de *Rosa hybrida* cv. Peacei, Tropicana e Bridal Pink. KHOSH-KHUI (1982b) também afirma que as melhores taxas de multiplicação e desenvolvimento foram obtidas por ele com explantes de 3 a 3,5 mm de diâmetro. Este resultado é concordante com o de KORUZA e JELASKA (1993) que observaram em videira que, quanto menor o explante meristemático retirado, menor a chance de sobrevivência.



### 3.3.3 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE PROLIFERAÇÃO

A ANOVA para as duas variáveis analisadas, demonstrou existir diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos aplicados. Na TABELA 4, abaixo, pode ser visto o resultado do teste de Tukey para comparação de médias.

TABELA 4 - Efeito de três combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo MS sobre a proliferação de gemas axilares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Tratamento	Nº Gemas/explante	Nº Folhas/explante
T1 - MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	4,40 a	3,60 a
T2 - MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	3,70 b	1,38 b
T3 - MS + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> ANA + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	2,38 c	0,93 b

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 99% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CARELLI e ECHEVERRIGARAY (2002) testaram CIN, 2iP e BAP e concluíram que BAP foi a citocinina que produziu o maior número de gemas por explante. A multiplicação ocorreu em todos os tratamentos, isso pode ter ocorrido em função da presença do BAP no meio a 1 mg.L<sup>-1</sup>. BRESSAN (1982) cita que a concentração de maior eficiência do BAP para *Rosa x hybrida*, em fase de proliferação de gemas, é 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. O resultado obtido também pode ser em função da presença de GA<sub>3</sub> no meio nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup>. Estes resultados concordam com HASEGAWA, (1979) que afirma que baixas concentrações de GA<sub>3</sub> (0,10 a 0,25 mg.L<sup>-1</sup>) na presença de BAP aumentam em até 95% a formação de gemas do explante de *Rosa x hybrida*. A presença do ANA no meio de cultura originou pequenas formações calosas nas áreas onde o tecido foi danificado. Experiência semelhante foi relatada por HASEGAWA (1980), que combinou BAP com ANA na tentativa de multiplicar gemas de *Rosa x hybrida*. Este autor obteve pequenos calos friáveis de cor verde claro no limbo foliar e na área do corte basal. Da mesma maneira, Os meios de cultura que não tinham ANA em sua composição (T1 e T2) apresentaram um maior número de gemas por explante em comparação ao meio com ANA (T3). O número de gemas formadas por explante também diminuiu significativamente quando a concentração de GA<sub>3</sub> aumentou de 0,10 mg.L<sup>-1</sup> (T1) para 0,25 mg.L<sup>-1</sup> (T2).

Neste caso especificamente não é necessária a análise fatorial por componentes principais, pois o tratamento T1 obteve superioridade estatística para as duas variáveis, ficando assim consolidado como tratamento mais eficiente.

### 3.3.4 ESTABELECIMENTO DO MEIO DE ENRAIZAMENTO

A ANOVA para as duas variáveis analisadas (TABELA 5), indica que para a variável comprimento da maior raiz, há uma superioridade estatística do tratamento MS½, com uma média de 3,83 cm. Esta diferença também foi verificada na variável número de raízes por broto, pois o tratamento MS½ foi superior ao MS+AIB, não diferindo do MS.

TABELA 5 - Número de raízes e comprimento da maior raiz de *Rosa x hybrida* cv. Vegas, no experimento de enraizamento de brotações provenientes de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Nº Raízes/broto	Comprimento (cm)	Enraizamento (%)
MS ½	2,13 a	3,83 a	86,66
MS	1,66 ab	3,26 b	60,00
MS + AIB	1,40 b	1,90 C	40,00

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente entre si a 99% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O enraizamento de brotações de *Rosa x hybrida* sem a presença de reguladores de crescimento já foi reportada por SKIRVIN e CHU (1979) e por ROUT et al. (1990). DOUGLAS et al. (1989) conseguiram o enraizamento de gemas de *Rosa floribunda* sem a utilização de reguladores de crescimento e cultivando seu material em meio MS¼. O desenvolvimento de raízes utilizando o AIB também já foi conseguido em *Rosa x hybrida* por ROUT et al. (1990). O autor obteve 92 a 98% de enraizamento usando de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> desta auxina. IBRAHIM e DEBERGH (2001) testaram diversas concentrações de AIB (0,1 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) e concluíram que uma baixa concentração de AIB (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) foi mais eficiente que as demais, porém seu melhor resultado foi obtido com meio MS½ assim como neste trabalho. A baixa concentração de sais é uma característica dos meios de cultura para enraizamento em geral. Uma leve deficiência, de nitrogênio e de micronutrientes é benéfica ao enraizamento (TORRES, 1998).

### 3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta etapa permitiram desenvolver um protocolo de micropropagação por meio de gemas axilares para *Rosa x hybrida* cv. Vegas. O estabelecimento *in vitro* foi obtido pelo cultivo de gemas axilares com 5 a 7 primórdios foliares, retirados das axilas das folhas da porção mediana da haste floral. As gemas apresentaram melhor desenvolvimento em meio MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA. A melhor taxa de multiplicação foi obtida em meio MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. O enraizamento ocorreu naturalmente em meio MS½ sem necessidade de reguladores de crescimento.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARA, K.A., HOSSAIN, M.M., QUASIM, M.A., ALI, M., AHMED, J.U. Micropropagation of rose: *Rosa* sp. cv. 'Peace'. **Plant Tissue Culture**, n. 7, p. 135-142, 1997.
- BARVE, D.M., IYER, R.S., KENDURKAR, S., MASCARENHAS, A.F. An efficient method for rapid propagation of some budded rose varieties. **Indian Journal of Horticulture**, v. 41, p. 1-7. 1984.
- BRESSAN, P.H., KIM, Y.J., HYNDMAN, S.E., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., Factors affecting in vitro propagation of rose. **Journal of American Society of Horticultural Science**, n.107, p. 979-990, 1982.
- CARELLI, B. P.; ECHEVERRIGARAY, S. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. **Scientia Horticulturae**, n. 92, p. 69-74, 2002.
- CHU, C.Y., KNIGHT, S.L., SMITH, M.A.L. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. 'Minima'). **Plant Cell Tissue Culture**, n. 32, p. 329-334, 1993.
- DAVIES, D.R. Rapid propagation of roses in vitro. **Scientia Horticulturae**, n.13, p. 385-389, 1980.
- DOUGLAS, G.C., RUTLEDGE, C.B., CASEY, A.D., RICHARDSON, D.H.S. Micropropagation of floribunda ground cover and miniature roses. **Plant Cell Tissue Culture**. n.19, p. 55-64, 1989.
- ELLIOTT, R.F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora*. **Planta**, n.95, p. 183-186, 1970.
- GOLDMAN, J.J.; HANNA, W.W.; FLEMING, G.; OZIAS, A.P. Fertile transgenic pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature embryo-derived embryogenic tissues. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 999-1009, 2003.
- GRAIFENBERG, A., GIUSTINIANI, L., PAPANDREOU, A. In vitro culture of shoot apices of *Rosa multiflora* Thumb. and *Rosa indica* Mayor. **Agric Ital.** n.1(3), p.119-128, 1975.
- HASEGAWA, P.M. In vitro propagation of rose. **Horticultural Science**, n.14, 610-612, 1979.
- HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of American Society of Horticulture Science**, n.105, p. 216-220, 1980.
- HYNDMAN, S.E., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. **Horticulture Science**. n.17, p. 82-83, 1982.

- IBRAHIM, R., DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida*), **Scientia Horticulturae**, v. 88 p. 41-57, 2001.
- JAIN, S. M.; PEHU, E. The prospects of tissue culture and genetic engineering for strawberry improvement. **Acta Agriculturae Scandinavica**, n. 3, p. 133-139, 1992.
- KHOSH-KHUI, M., SINK, K.C., Micropropagation of new and old world Rosa species. **American Journal of Horticulture Science**, v.57, p.315–319, 1982(a).
- \_\_\_\_\_. Callus induction and culture of Rosa, **Scientia Horticulturae**, v. 17, p. 361-370, 1982(b).
- KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv 'Refosk'). **Vitis**, v. 32, n. 1, p. 59-60. 1993.
- MARCELIS-VAN ACKER, C.A.M., SCHOLTEN, H.J. Development of axillary buds on rose in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 63, p. 47-55, 1995.
- MEDEROS, S., ENRIGUEZ, M.J.R. In vitro propagation of 'Golden Times' roses. Factors affecting shoot tips and axillary bud growth and morphogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 212, p. 619-624, 1987.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PARK, M.; et al. Generation of chlorsulfuron-resistant transgenic garlic plants (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. **Molecular Breeding**, n. 9, p. 171-181, 2002.
- PIERIK, R.L.M; *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. **Physiology Plantarum**, n. 82, p. 37-80, 1976.
- ROUT, G.R., DEBATA, B.K, DAS, P. In vitro mass-scale propagation of *Rosa hybrida* cv. 'Landora'. **Curr. Sci.** n. 58, p. 876-878, 1989(a)
- \_\_\_\_\_. Micropropagation of *Rosa hybrida* cv. 'Queen Elizabeth' through in vitro culture of axillary buds. **Orissa Journal of Horticulture**, n. 16, p. 1-9, 1989(b).
- ROUT, G.R., DEBATA, B.K., DAS, P. In vitro clonal multiplication of roses. **Proc. Natl. Acad.Sci.** n. 60, p. 311-318, 1990.
- SAIRAM, R.V.; PARANI, M; FRANKLIN, G; LIFENG, Z; SMITH, B; MACDOUGALL, J; WILBER, C; SHEIKHI, H; KASHIKAR, N; MEEKER, K; AL-ABED, D; BERRY, K; VIERLING, R; GOLDMAN, S. L. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. **Genome**, n. 46, p. 323-329, 2003.
- SAUER, A., WALTHER, F., PREIL, W. Different suitability for in vitro propagation of Rose cultivars. **Gartenbauwissenschaft**, n. 50, p. 133-138, 1985.
- SKIRVIN, R. M.; CHU, M.C. In vitro propagation of 'Forever Yours' rose. **Horticultural Science**. n.14, p. 608-610, 1979.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais, **Instituto Agrônomo de Campinas – Boletim Técnico**, n. 174, p. 40-45, 1998.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Ed. Embrapa –SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 1998.

- VARDJA, R.; VARDJA, T. Mass propagation of the dwarf rose cultivar 'Victory Parade', **Eesti Teaduste Akadeemia Toimetised Bioloogia**, n. 44, p. 3-4, 119-123, 1995.
- VOYIATZI, C., VOYIATZI, D.G., TSIKMAKI, V. In vitro shoot proliferation rates of the rose cv. (*Hybrid Tea*) 'Dr. Verhage', as affected by apical dominance regulating substances. **Scientia Horticulturae**, v. 61, p. 241-249, 1995.
- WELANDER, M.; PAWLICKI, N. Genetic transformation of the apple rootstock M26 with RoIB gene and its influence on rooting. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 371-380, 1998.
- YAN, M., BYRNE, D.H., JING, C. Propagation of rose species *in vitro*. *In vitro* Cellular and Developmental Biology. **Plant**, v. 32 n.2, p. 103-108, 1996.
- ZIESLIN, N., HALEVY, A.H. Components of axillary bud inhibition in rose plants. In The effect of different plant parts correlative inhibition. **Botanical Gazette**, n.137, p. 291-296, 1976.

## 4 CAPÍTULO III – Obtenção de Explantes Foliares Assépticos para Indução de Organogênese

### 4.1 INTRODUÇÃO

As contaminações na cultura de tecidos podem causar muitos prejuízos no processo de micropropagação, deixando o explante inapto para o subcultivo ou até levando-o a morte. Esse problema é aumentado quando a contaminação não se expressa durante os estádios iniciais da cultura e somente é detectada após sucessivas repicagens (TORRES, 1998).

O processo de assepsia na introdução do material vegetal *in vitro* apresenta a dificuldade de encontrar um equilíbrio entre o ponto ideal de desinfecção superficial e a sobrevivência do explante isolado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Vários compostos são utilizados como agentes desinfetantes como, por exemplo, o etanol e outros compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Também podem ser encontrados trabalhos que utilizam cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, peróxido de dihidrogênio, entre outros (TORRES, 1998). Uma diversidade grande de tratamentos é encontrada quando o assunto é assepsia de explantes. Métodos simples como uma lavagem com etanol a 70% obtiveram sucesso com gemas axilares de *Rosa x hybrida* (TOMBOLATO e COSTA, 1998). WILSON (1998), quando trabalhou com *Rosa x hybrida* cv. Folklore, obteve o melhor resultado mergulhando os segmentos nodais em cloreto de mercúrio a 0,08% (m/v). JEHANGIR et al. (1998) utilizaram cloreto de mercúrio a 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% (m/v) e também obtiveram bons resultados para desinfecção de tecidos de *Rosa x hybrida*. Já NICOLOSO et al. (2001) não obtiveram sucesso na micropropagação do ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) quando tentaram desinfestar folhas utilizando cloreto de mercúrio a 0,1% (v/v). As folhas apresentaram sensibilidade ao cloreto necrosando sem regenerar. O cloreto de mercúrio é altamente tóxico para seres humanos e, portanto, deve ser manejado com muito cuidado. Podem ser usados outros compostos, por exemplo antibióticos como a ampicilina, amoxicilina, kanamicina e gentamicina, ou ainda seqüências de produtos como: hipoclorito de sódio a 3% + Tween-20® por 15 min.; etanol 95% por 5 segundos + hipoclorito de sódio a 0,25% + Tween-20® por 10 min. ou ainda peróxido de dihidrogênio a 35% + Tween-20® por 10 min. (CASTRO, 1999; SALEHI, 1997). O hipoclorito de cálcio também é

utilizado na desinfecção, por ser menos agressivo ao tecido vegetal do que o de sódio (HASEGAWA et al., 1989). Combinações de antibióticos e fungicidas também são comuns, como o tratamento com sulfato de streptomicina a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 2 min., seguido de 15 min. de imersão em hipoclorito a 1% ou benomyl ( $400 \text{ mg.L}^{-1}$ ) combinado com sulfato de streptomicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguido de uma imersão em hipoclorito de sódio (0,5%, 1% ou 2%). O benomyl, quando usado em concentrações que variam de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $2 \text{ g.L}^{-1}$  é indicado para o uso em desinfecção, pois além de ter um amplo espectro de ação, é pouco fitotóxico (DANTAS et al., 2000). Entre os antibióticos recomenda-se o uso de polimixina B, rifampicina e cefotaxima (RAMIREZ DEL CASTILLO e ANGARITA ZERDA, 1990, GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O melhor processo de desinfecção, para gemas apicais de rosa encontrado por HAN et al. (2000) foi a imersão em hipoclorito de sódio a 0,3% por 20 minutos, seguido por banho de nitrato de prata a 0,1% (m/v) por 1 hora.

KAZEMPOUR (2002), trabalhando com tomateiro conseguiu a assepsia explantes foliares utilizando clorofórmio sob forma gasosa. O autor relata que o clorofórmio é um potente agente de desinfecção que não penetra nas aberturas naturais das folhas como estômatos e lenticelas. RAMIREZ e SALAZAR (1998), trabalhando com goiabeira (*Psidium guajava* L.), obtiveram explantes foliares assépticos, submetendo segmentos foliares de 5 x 5 cm a um tratamento de imersão de 30 minutos com benomyl ( $14 \text{ g.L}^{-1}$ ) + rifampicina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguido de imersão por 1 min. em álcool 70% e em cloreto de cálcio (10%) por 15 min. Mesmo tendo conseguido explantes assépticos, os autores relatam que o método tem baixa eficiência (15%), pois causa necrose nas folhas, que perdem a viabilidade. PARKINSON (1996) usou dicloroisocianurato de sódio em solução para obtenção de explantes foliares assépticos de *Quercus robur*, *Spatyphyllium walisii* e *Anthurium andreanum*. As folhas foram submergidas em uma solução com concentração de 5000 ppm (v/v) causando necrose apenas em folhas velhas ou folhas jovens expostas por longos períodos (48h).

As concentrações das soluções desinfestantes assim como as combinações dos princípios ativos e os tempos de exposição podem variar muito. Considerando-se a sensibilidade do material a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e o tempo de exposição de maneira inversamente proporcional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Existe uma variedade grande de trabalhos, propondo métodos completamente diferentes, não existindo, portanto, um consenso quanto ao método de desinfestação de explantes de rosa.



O objetivo desta etapa é determinar o processo mais eficaz para obtenção de explantes foliares assépticos, dentre os tratamentos testados.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos desta fase foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR.

Os dados estatísticos foram analisados utilizando o software StatGraphics® 5.0 plus da empresa StatSoft®. Foi realizado um teste de qui-quadrado para verificar a relação existente entre o tratamento aplicado e o resultado obtido. Para seleção do melhor tratamento foi utilizado o método multivariado de análise fatorial por matriz tetracórica.

### 4.2.1 SELEÇÃO E PREPARO DE MATRIZES

As hastes florais do cv. Vegas – classificadas como longa (60 cm) – utilizadas para o fornecimento de explantes provieram de um produtor localizado no município de Andradas, Minas Gerais. As hastes, logo após o recebimento, foram pré-tratadas, tendo suas folhas e acúleos retirados para que ficasse somente a estaca com as gemas axilares.

### 4.2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

O objetivo desta etapa foi obter explantes foliares livres de contaminantes. Foram realizados experimentos, *in vitro* e *ex vitro*. Os *in vitro* basearam-se na brotação das estacas em ambiente asséptico e posterior retirada de explantes livres de contaminantes. O *ex vitro* foi constituído por um experimento de brotação com posterior assepsia das folhas, inoculando-as em meio de regeneração imediatamente após a desinfestação.

Os experimentos foram incubados em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes de irradiância de 40 W.m<sup>-2</sup>, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 25 ± 2 °C. Todos os procedimentos de assepsia e isolamento foram realizados em camara de fluxo laminar.

#### 4.2.3 BROTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS *IN VITRO*

As hastes florais foram cortadas em segmentos de aproximadamente 4 cm depois de passarem pelo pré-tratamento, onde cada segmento continha apenas uma gema (FIGURA 1). Estes segmentos nodais, como serão denominados de agora em diante, foram então submetidos aos diversos processos de assepsia testados durante esta fase da pesquisa.



FIGURA 1 - Segmento nodal de 4 cm de *Rosa x hybrida* cv. Vegas com uma gema axilar.

##### 4.2.3.1 Experimento I – Efeito do Etanol e NaClO na desinfestação de segmentos nodais:

Iniciou-se o estabelecimento de culturas assépticas, com tratamentos clássicos que combinam o uso de hipoclorito de sódio (NaClO) e etanol (etOH) 70% em diversas combinações de concentração e tempo conforme indicado a seguir:

- T0 – Testemunha (água estéril)
- T1 – etOH 70% por 1 min + NaClO 1% por 5 min.
- T2 – NaClO 1% por 5 min.
- T3 – etOH 70% por 1 min + NaClO 2% por 5 min.
- T4 – NaClO 2% por 5 min.

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos, 20 repetições e dois segmentos nodais por repetição, totalizando 200 segmentos nodais. Os explantes foram isolados em meio MS e mantidos em sala de crescimento por 10 dias quando foram avaliados quanto à presença de contaminação bacteriana e fúngica, necrose e presença de brotação e aproveitamento.

#### 4.2.3.2 Experimento II - Efeito de diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais:

Testou-se um conjunto de 54 métodos de assepsia, que serão descritos a seguir. Os produtos foram utilizados na forma líquida e o processo de desinfecção foi por imersão dos segmentos nodais nas soluções pelo tempo indicado na descrição do tratamento. Após o tratamento, os segmentos foram enxaguados três vezes em água estéril e isolados. Nos casos em que se aplicou mais de uma solução, foi feito apenas um enxágüe em água estéril entre uma solução e outra.

- T0 – Testemunha (água estéril)
- T1 - Citrobio® 0,5% por 10 min;
- T2 - etOH 70% por 10 min + Citrobio® 0,5%;
- T3 - Citrobio® 1% por 10 min;
- T4 - etOH 70% por 10 min + Citrobio® 1%;
- T5 - Citrobio® 2% por 10 min;
- T6 - etOH 70% por 10 min + Citrobio® 2%;
- T7 - Citrobio® 1% por 15 horas (explante com a epiderme retirada);
- T8 - Citrobio® 2% por 15 horas (explante com a epiderme retirada);
- T9 -  $\text{CuSO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T10 -  $\text{CuSO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T11 - etOH 70% por 1 min +  $\text{CuSO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T12 - etOH 70% por 2 min +  $\text{CuSO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T13 -  $\text{CuSO}_4$  3 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T14 -  $\text{CuSO}_4$  3 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T15 - etOH 70% por 1 min +  $\text{CuSO}_4$  3 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T16 - etOH 70% por 2 min +  $\text{CuSO}_4$  3 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;

- T17 - Benomyl 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T18 - Benomyl 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T19 - etOH 70% por 1 min + benomyl 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T20 - etOH 70% por 2 min + benomyl 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T21 - Benomyl 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T22 - Benomyl 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T23 - etOH 70% por 1 min + benomyl 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T24 - etOH 70% por 2 min + benomyl 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T25 - Mefenoxam 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T26 - Mefenoxam 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T27 - etOH 70% por 1 min + mefenoxam 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T28 - etOH 70% por 2 min + mefenoxam 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T29 - Mefenoxam 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T30 - Mefenoxam 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T31 - etOH 70% por 1 min + mefenoxam 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T32 - etOH 70% por 2 min + mefenoxam 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T33 - Ampicilina dissódica (80 mg.L<sup>-1</sup>) por 10 min;
- T34 - Gentamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) por 10 min;
- T35 - Sulfato de Streptomicina (80 mg.L<sup>-1</sup>) por 2 min + NaClO 1% por 15 min;
- T36 - Polivinil Pirrolidona Iodo por 15 min;
- T37 - etOH 70% por 15 min + polivinil pirrolidona Iodo por 5 min;
- T38 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 1 hora + NaClO 0,3% por 20 min;
- T39 - etOH 95% por 10 seg + NaClO 0,3% por 10 min;
- T40 - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tween-20<sup>®</sup> por 10 min;
- T41 - NaClO 3% por 15 min + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 40 min;
- T42 - Benomyl 14 g.L<sup>-1</sup> por 30 min + AgNO<sub>3</sub> 0,1 % por 10 min;
- T43 - Benomyl 14 g.L<sup>-1</sup> + Sulfato de streptomicina 80 mg.L<sup>-1</sup> (1:1 v/v) por 14 horas;
- T44 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% + Penicilina (300 mg.L<sup>-1</sup>) por 15 min;
- T45 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 5 min + etOH 70% por 5 min + CaClO 0,25% por 5 min;
- T46 - Chlorothalonil 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T47 - Chlorothalonil 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T48 - etOH 70% por 1 min + chlorothalonil 1 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T49 - etOH 70% por 2 min + chlorothalonil 1 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;
- T50 - Chlorothalonil 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T51 - Chlorothalonil 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;

- T52 - etOH 70% por 1 min + chlorothalonil 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min;
- T53 - etOH 70% por 2 min + chlorothalonil 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min;

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com 54 tratamentos e 10 repetições por tratamento, totalizando 540 segmentos nodais. Os explantes foram isolados em 10ml de meio MS vertidos em frascos, e mantidos em sala de crescimento por 10 dias quando foram avaliados quanto à presença de contaminação bacteriana e fúngica, necrose e presença de brotação.

#### 4.2.3.3 Experimento III - Efeito dos 4 melhores tratamentos do Experimento II na desinfestação de segmentos nodais:

Este experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 30 repetições. Um tratamento testemunha não foi incluso neste teste uma vez que já era sabido por meio dos experimentos anteriores que o tratamento testemunha apresentava 100% de contaminação. Os segmentos nodais foram imersos nas soluções pelo tempo estipulado na descrição de cada tratamento. Quando foi utilizada mais de uma solução para tratar o explante, foi feito um enxágüe com água estéril entre cada solução. Os segmentos foram enxaguados três vezes em água estéril antes de serem inoculados em meio MS. Os tratamentos testados foram os seguintes:

- T1 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 5 min + etOH 70% por 5 min + CaClO 0,25% por 5 min;
- T2 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 1 hora + NaClO 0,3% por 20 min;
- T3 - CuSO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min + etOH 70% por 1 min;
- T4 - CuSO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min + etOH 70% por 2 min;

Os explantes foram isolados em meio MS e mantidos em sala de crescimento por 10 dias e em seguida foram avaliados quanto à presença de contaminação bacteriana e fúngica, necrose e presença de brotação.

#### 4.2.3.4 Experimento IV – Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais na necrose por infiltração de nitrato de prata:

O quarto experimento deste grupo constituiu na confirmação de uma observação realizada no experimento III que será apresentada na discussão dos resultados. Neste experimento realizou-se o corte das regiões basal e apical dos segmentos nodais após o tratamento de assepsia, eliminando assim a área onde o nitrato de prata estivesse infiltrado. Os explantes foram imersos na solução de nitrato de prata por 1 hora. Depois deste período, foram enxaguados com água estéril e então imersos em hipoclorito a 0,3% (v/v) por 20 minutos e então enxaguados 3 vezes em água estéril. Depois do tratamento foram cortados 5 mm de cada extremidade do explante que foi então isolado. Foram testados:

- T0 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 1 hora + NaClO 0,3% por 20 min (sem corte);
- T1 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 1 hora + NaClO 0,3% por 20 min (com corte);

O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e 40 repetições. Os explantes foram inoculados em meio MS e incubados em sala de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas a 25±2°C durante 10 dias quando então foram avaliados pela presença de contaminação fúngica e bacteriana, necrose e presença de brotação.

#### 4.2.3.5 Experimento V – Efeito do digluconato de clorexidina na desinfestação de segmentos nodais.

O digluconato de clorexidina (1,1 - bis hexametileno (5 – p - clorofenil biguanida) di – D -Digluconato) é um germicida de uso hospitalar e veterinário, com ação fúngica e bacteriana (BAYER, 2003). Foram aplicados 12 tratamentos com 30 repetições cada, implantados no delineamento inteiramente casualizado. O tratamento testemunha não foi realizado, pois outros experimentos já apresentaram 100% de contaminação indicando a necessidade de desinfestação. Os explantes foram imersos na solução de digluconato de clorexidina pelo tempo estipulado na descrição de cada tratamento e em seguida enxaguados 3 vezes em água estéril para então serem isolados. Foram os tratamentos:

- T1 - Digluconato de clorexidina a 0,5% por 5 min;
- T2 - Digluconato de clorexidina a 0,5% por 10 min;
- T3 - Digluconato de clorexidina a 0,5% por 15 min;
- T4 - Digluconato de clorexidina a 1% por 5 min;
- T5 - Digluconato de clorexidina a 1% por 10 min;
- T6 - Digluconato de clorexidina a 1% por 15 min;
- T7 - Digluconato de clorexidina a 2% por 5 min;
- T8 - Digluconato de clorexidina a 2% por 10 min;
- T9 - Digluconato de clorexidina a 2% por 15 min;
- T10 - Digluconato de clorexidina a 4% por 5 min;
- T11 - Digluconato de clorexidina a 4% por 10 min;
- T12 - Digluconato de clorexidina a 4% por 15 min;

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento por um período de 10 dias ao término do qual foram avaliados quanto à presença de contaminação bacteriana e fúngica, necrose e presença de brotação.

#### 4.2.3.6 Experimento VI – Efeito do tratamento com baixa temperatura na porcentagem de oxidação de segmentos nodais

Foram testados tempos de armazenamento em geladeira ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) das hastes florais a fim de verificar o efeito da redução de metabolismo na oxidação dos segmentos nodais *in vitro*. As hastes florais foram empacotadas com três camadas de jornal. Em seguida, o pacote foi umedecido com água de torneira e armazenado em geladeira pelo período estabelecido na descrição de cada tratamento. Realizou-se o seguinte experimento fatorial, combinando 3 concentrações e digluconato de clorexidina e duração do tratamento com baixa temperatura:

- Digluconato de clorexidina a 0,5%, 1% ou 2% por 10 min.
- 4, 5, 6 ou 7 dias de frio

Este experimento totaliza 12 tratamentos com 20 repetições cada, implantado no delineamento inteiramente casualizado. Os explantes foram inoculados em meio MS e



mantidos em sala de crescimento por um período de 10 dias ao final do qual foram avaliados quanto a presença de contaminação bacteriana e fúngica, oxidação e presença de brotação.

#### 4.2.4 BROTAÇÃO DE HASTES FLORAIS *EX VITRO*

Este experimento teve por objetivo provocar o brotamento de hastes florais *ex vitro*, acondicionadas em sala de crescimento, para que pudesse ser feita a coleta de folhas. Estas folhas foram submetidas a processos de assepsia para serem utilizadas no experimento descrito posteriormente.

As hastes florais foram pré-tratadas, com a retirada de suas folhas e acúleos. Depois disto, foram escovadas com digluconato de clorexidina a 0,5%. Uma atenção especial foi dada à cunha formada pela gema axilar e o caule onde se deposita uma grande quantidade de partículas de sujeira. Depois de escovadas, as hastes foram enxaguadas com água de torneira e em seguida cortadas em estacas de cerca de 25 cm de comprimento. A seguir, as estacas foram colocadas em vidros de 8 cm de diâmetro e 20 cm de altura, com 150 ml de água de torneira, volume que mantinha imersos 5 cm da base da estaca (FIGURA 2). Os vidros com o material vegetal foram incubados em sala de crescimento e levaram de 10 a 15 dias para emitirem as brotações.



FIGURA 2 - Estacas de *Rosa x hybrida* cv. Vegas brotadas *ex vitro*.

As brotações foram separadas das estacas e colocadas em tubos de ensaio contendo a solução de digluconato de clorexidina. Estes tubos foram tampados e mantidos em agitação pelo tempo determinado na descrição de cada tratamento. Os brotos foram enxaguados 3 vezes em água estéril e a seguir as folhas foram destacadas e cortadas ao meio em placas-de-petri contendo água estéril para evitar o ressecamento. O experimento constituiu em variar as concentrações e tempos de exposição das folhas ao digluconato de clorexidina conforme esquema abaixo:

- Digluconato de clorexidina (0,5%, 1% e 2%).
- Tempo (0, 2, 5, 10 minutos)

O experimento foi composto por 12 tratamentos e 20 repetições por tratamento. As folhas foram inoculadas em meio MS e incubadas em sala de crescimento durante 10 dias, após os quais foram avaliadas quanto à presença de contaminação bacteriana, fúngica e necrose de tecidos.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 BROTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS *IN VITRO*

#### 4.3.1.1 Experimento I – Efeito do Etanol e NaClO na desinfestação de segmentos nodais

O teste de qui-quadrado para a contaminação fúngica, mostrou que há relação entre o tratamento aplicado e a resposta obtida, com um nível de confiança de 99%, para todas as variáveis analisadas exceto para contaminação bacteriana ( $P=0,2464$ ). Isto indica que os tratamentos aplicados não surtiram efeito estatisticamente significativo no controle bacteriano.

O tratamento testemunha (sem desinfestante), apresentou como era esperado um índice de 100% de contaminação fúngica e bacteriana. Na TABELA 6 pode ser observado que, para a concentração de 1% de hipoclorito, o tratamento com etanol reduziu a porcentagem de contaminação fúngica, não surtindo efeitos visíveis na contaminação bacteriana. Porém, aumentado-se a concentração de hipoclorito para 2%, obtiveram-se melhores resultados. A taxa de contaminação foi reduzida de 80 para 50% no caso onde não foi aplicado etanol e de 70 para 40% onde foi aplicado. Em um tratamento semelhante SKIRVIN et al (1986) utilizaram etanol 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio 0,8% por 10 minutos e obteve segmentos nodais assépticos de amoreira (*Rubus sp.*). Esta diferença entre os graus de sucesso obtidos pode ser devida à qualidade fitossanitária do material inicial utilizado ou ao maior tempo de exposição.

Os melhores resultados foram obtidos com as combinações de hipoclorito a 2% com etanol e sem etanol. Este resultado confirma o de VESCO et al. (1999) que obtiveram 90% de descontaminação de segmentos nodais de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) utilizando imersão em hipoclorito de sódio a 2% durante 5 minutos.

TABELA 6 - Efeito da desinfestação com Etanol 70% (1 min) e NaClO (5 min) de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Tratamento	Incidência de Fungos (%)	Incidência de Bactérias (%)	Incidência de Necrose (%)	Brotação (%)
Testemunha	100	100	80	0
NaClO 1%	80	45	65	10
etOH 70% + NaClO 1%	70	45	65	5
NaClO 2%	50	45	80	15
etOH 70% + NaClO 2%	40	35	75	15

TODA et al (1995) utilizando etanol 70% seguido de hipoclorito de sódio a 2% em segmentos nodais de *Rhus saccidanea* L., por 5 minutos, também obtiveram sucesso na obtenção de segmentos nodais assépticos. Porém, nos trabalhos de ambos os autores, não foi reportada a necrose nos explantes. Esta diferença pode ser explicada, pois nos dois casos não se tratavam de explantes de espécies do gênero *Rosa*. Além deste fato, uma análise estatística comprova que no experimento realizado neste trabalho, a necrose tem relação estreita com o aparecimento de contaminação fúngica (64,57%) e bacteriana (79,05%) que pode ser observado no QUADRO 2 a seguir.

QUADRO 2 - Índice de correlação entre variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas utilizando etanol e hipoclorito de sódio.

	Fungo	Bactérias	Necrose	Brotação
Fungo		0,0145 0,2517	<b>0,6457</b> <b>0,0001</b>	0,1527 0,2471
Bactérias			<b>0,7905</b> <b>0,0024</b>	0,2478 0,0924
Necrose				<b>0,8547</b> <b>0,0031</b>
Brotação				

O 1º valor na linha refere-se à correlação entre as variáveis e o 2º valor na linha refere-se ao valor de P desta correlação indicando o nível de significância estatística

Para contaminação bacteriana, o valor de qui-quadrado ( $P=0,451$ ) indicou não haver relação entre os tratamentos aplicados e o controle de contaminação. Este fato pode ser devido à ineficácia do hipoclorito para os tipos de bactérias presentes ou ainda às concentrações e tempo de exposição reduzidos. Outros experimentos podem ser realizados para verificar se concentrações mais altas e maiores tempos de exposição poderiam surtir efeito sobre o controle da contaminação bacteriana. A exemplo tem-se o trabalho de IBRAHIM e DEBERGH (2001) que obteve segmentos nodais de rosa livres de

contaminantes usando hipoclorito de sódio a 5,25% num banho de 10 minutos. Ou ainda PAVINGEROVA et al (2000) também obtiveram segmentos nodais assépticos de azalea (*Rhododendro indicum*) utilizando alta concentração de hipoclorito (5%) por 10 minutos sem causar danos a seus explantes.

As taxas de necrose observadas na TABELA 6 foram relativamente altas, variando de 65 a 80%. Pode-se observar no QUADRO 2, que neste experimento é comprovado estatisticamente que a necrose está diretamente relacionada com a presença de microorganismos (fungos e bactérias). É bem provável que a ação destes agentes possa ter causado este efeito fitotóxico. Segundo BERGAMIN et al. (1995), os microorganismos podem atuar de diversas formas no hospedeiro: danificando as células da planta e promovendo a liberação de nutrientes para as atividades metabólicas do patógeno, ocasionando a liberação de enzimas degradativas, promovendo e acelerando a senescência do hospedeiro.

Observando-se a TABELA 6 pode-se concluir que o tratamento de 2% de hipoclorito com e sem álcool produziu as melhores taxas de brotação (15%). A variável brotação foi diretamente afetada pela incidência de necrose (85,47%) como pode ser observado no QUADRO 2. Como já foi comentado, a degeneração dos tecidos causada pela ação de microorganismos foi responsável por esta alta correlação.

Em conclusão, pode-se dizer que o melhor tratamento deste experimento é o banho com álcool 70% durante 1 minuto seguido de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos pois foi aquele que obteve como resultado menores taxas de contaminação fúngica, bacteriana e necrose, além de apresentar uma das maiores taxas de brotação.

#### 4.3.1.2 Experimento II - Efeito de diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais:

Primeiramente foi realizado um teste de qui-quadrado (TABELA 7) para cada uma das variáveis medidas para estabelecer se havia relação entre os tratamentos efetuados e os resultados obtidos. Para todas as variáveis o resultado foi estatisticamente significativo a 99% de probabilidade. Sendo significativo, denota que os resultados obtidos foram decorrentes dos tratamentos aplicados. Os valores de qui-quadrado podem ser visualizados a seguir.

TABELA 7 - Valores de qui-quadrado obtidos para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Variável	Qui-quadrado	Grau de Liberdade	Valor de P
Fungos	1590,39	53	0,0000**
Bactérias	518,58	53	0,0000**
Necrose	1710,91	53	0,0000**
Brotação	1999,39	53	0,0000**

A TABELA 8 apresenta o resumo dos níveis de contaminação, necrose e brotação para este experimento.

TABELA 8 - Efeito dos diversos tratamentos na desinfestação de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Tratamento	Fungo (%)	Bactéria (%)	Oxidação (%)	Brotação (%)	Tratamento	Fungo (%)	Bactéria (%)	Oxidação (%)	Brotação (%)
T0	100	80	100	0	T27	80	50	40	0
T1	40	70	100	30	T28	90	40	90	10
T2	70	50	90	10	T29	70	60	90	0
T3	60	30	100	0	T30	70	30	90	10
T4	80	70	80	0	T31	80	40	80	0
T5	90	60	90	0	T32	80	40	90	0
T6	90	30	90	0	T33	70	30	90	0
T7	40	50	50	10	T34	90	40	90	10
T8	10	100	60	50	T35	90	80	100	0
T9	80	70	70	0	T36	90	30	70	30
T10	100	50	70	0	T37	90	40	80	0
T11	50	60	20	50	T38	20	50	30	70
T12	20	60	30	60	T39	80	70	90	20
T13	40	30	100	0	T40	70	60	70	0
T14	90	30	80	0	T41	80	30	90	0
T15	100	40	70	0	T42	60	30	80	0
T16	90	60	70	0	T43	50	60	60	0
T17	40	80	90	0	T44	90	40	80	0
T18	40	100	50	40	T45	10	20	10	60
T19	50	90	70	0	T46	90	50	90	10
T20	50	80	90	0	T47	60	50	40	0
T21	50	50	100	10	T48	40	100	50	20
T22	90	70	50	0	T49	50	100	60	30
T23	70	60	80	10	T50	30	100	80	20
T24	80	30	90	10	T51	60	100	80	10
T25	80	70	80	10	T52	90	40	80	0
T26	90	30	80	0	T53	90	40	70	0

Para uma análise mais eficiente deste experimento utilizou-se o método multivariado de AFMT. Na TABELA 9 pode-se visualizar o resultado desta análise.

TABELA 9 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas utilizando 54 diferentes tratamentos.

Tratamento	Escore Fatorial	Ranking	Tratamento	Escore Fatorial	Ranking
<b>45</b>	<b>3,2610</b>	1	14	-0,2856	28
<b>38</b>	<b>2,5425</b>	2	26	-0,2856	29
<b>12</b>	<b>2,3062</b>	3	24	-0,3158	30
<b>11</b>	<b>2,1671</b>	4	37	-0,3695	31
8	1,1010	5	44	-0,3695	32
18	0,9619	6	52	-0,3695	33
7	0,9241	7	33	-0,3836	34
47	0,8697	8	25	-0,3842	35
27	0,7004	9	13	-0,3969	36
48	0,6570	10	2	-0,399	37
49	0,4575	11	51	-0,4666	38
36	0,4389	12	41	-0,4682	39
43	0,3359	13	28	-0,4844	40
22	0,1806	14	34	-0,4844	41
42	-0,0316	15	21	-0,4969	42
50	-0,0602	16	39	-0,499	43
40	-0,1007	17	4	-0,5366	44
53	-0,1022	18	17	-0,5491	45
19	-0,1831	19	32	-0,5521	46
15	-0,1869	20	6	-0,5529	47
23	-0,2156	21	3	-0,5662	48
30	-0,2312	22	46	-0,5683	49
9	-0,2693	23	20	-0,6338	50
16	-0,2701	24	29	-0,6353	51
10	-0,2708	25	5	-0,8046	52
1	-0,2753	26	35	-1,2397	53
31	-0,2849	27	0	-1,3244	54

Com a análise fatorial (TABELA 9) podemos concluir que os quatro tratamentos que obtiveram os maiores graus de sucesso foram, na ordem: 45, 38, 12 e 11. Estes tratamentos consistiram em:

- T45 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 5 min + etOH 70% por 5 min + CaClO 0,25% por 5 min;
- T38 - AgNO<sub>3</sub> 0,1% por 1 hora + NaClO 0,3% por 20 min;
- T12 - CuSO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> por 40 min + etOH 70% por 2 min;
- T11 - CuSO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> por 10 min + etOH 70% por 1 min.

Este sucesso era esperado pois o nitrato de prata é um excelente biocida, com uso consagrado no ramo veterinário para assepsia de campos operatórios em cirurgias e

asepsia de cicatrizes no pós-operatório. O sucesso dos tratamentos a base de nitrato de prata, confirma o resultado obtido por HAN et al. (2000) que utilizaram o tratamento 38 ( $\text{AgNO}_3$  0,1% por 1 hora +  $\text{NaClO}$  0,3% por 20 min) para tratar explantes de *Epimedium koreanum* (ornamental rizomatosa da família *Berberidaceae*) e obtiveram 85% de rizomas assépticos. Rizomas são ainda mais contaminados que material de parte aérea devido ao contato com o solo, provando a eficácia do método. Também os tratamentos à base de sulfato de cobre têm sua eficiência contra fungos pois inibem enzimas essenciais para o desenvolvimento dos fungos (BERGAMIN et al, 1995). Devido à boa eficiência de produtos a base de cobre, talvez se pudesse testar a eficiência da calda bordaleza (ANEXO V) como método de asepsia de explantes, dando-lhe assim novo uso.

Os demais tratamentos atingiram níveis altos de contaminação e necrose, e níveis baixos de brotação, tornando-se inviáveis. Os tratamentos a base de Citrobio® (T1 a T8) apresentaram taxas relativamente altas de contaminações fúngicas e bacterianas (em média 57% fungos e 48% para bactérias). Esse resultado é confirmado por FETT e COOKE (2003) que testou o produto comercial Citrobio® a uma concentração de até  $20 \text{ ml.L}^{-1}$  em sementes de alfafa e obteve uma taxa de controle de 95% de *Escherichia coli* e *Salmonella sp* entre outras bactérias. O produto tem maior eficiência contra bactérias, pois é usado para evitar a podridão de frutos na pós-colheita. Esta característica pode ser utilizada para futuros experimentos onde o Citrobio® pode ser combinado a tratamentos com maior eficiência no controle de contaminação fúngica obtendo um eficiente método de asepsia. Os tratamentos a base de benomyl (T17 a T24) também apresentaram taxas altas de contaminação (em média 32% fungos e 68% bactérias). A contaminação fúngica teve uma taxa de controle razoável por este método, que, se combinado com outros métodos bactericidas eficientes, pode resultar em um método viável de asepsia. Um exemplo é o tratamento 43 que combina benomyl com sulfato de estreptomicina e ficou em oitavo lugar no *ranking* (50% fungos e 60% bactérias). Outro exemplo é o trabalho de MEDEIROS et al. (2000) que descreve o tratamento de cajazeira (*Spondias mombin L.*) com benomyl a  $2 \text{ g.L}^{-1}$  por 10 minutos, combinado com etanol a 70% por 1 minuto. Estes autores obtiveram 69% de contaminação bacteriana e 6% de contaminação fúngica. Os tratamentos utilizando antibióticos (gentamicina e ampicilina) foram baseados no trabalho de SALEHI (1997), que testou diversos antibióticos, em várias concentrações (20 a  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em banhos de 10 , 15 ou 30 minutos e obteve o melhor resultado com gentamicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 15 minutos (90% de controle de bactérias). Com ampicilina seu melhor resultado foi a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 30 minutos, enquanto que no presente trabalho foram obtidos com gentamicina (T34) 40% de



contaminação bacteriana, e com ampicilina (T33) 30%, o que torna estes dois tratamentos promissores para combinações com substâncias fungicidas eficientes.

#### 4.3.1.3 Experimento III - Efeito dos 4 melhores tratamentos do Experimento II na desinfestação de segmentos nodais:

Foi realizado um teste de qui-quadrado (TABELA 10) para todas as variáveis analisadas no experimento, para verificar a relação entre tratamento e resultado. No caso deste experimento o teste apresentou valores estatisticamente significativos a 99% de probabilidade, para todas as variáveis analisadas, como pode ser visto abaixo.

TABELA 10 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

Variável	Qui-Quadrado	G.L.	Valor de P
Fungos	52,82	3	0,0000**
Bactéria	16,72	3	0,0008**
Necrose	57,46	3	0,0000**
Brotação	95,32	3	0,0000**

Analisando os dados contidos na TABELA 11, pode-se observar que os tratamentos à base de nitrato de prata provocaram menores taxas de contaminação tanto fúngica quanto bacteriana, em relação aos tratamentos à base de sulfato de cobre. Quanto às taxas de necrose, estas também foram menores nos tratamentos à base de nitrato de prata. Já a porcentagem de brotação foi maior para este mesmo tratamento. Baseado nestas informações tem-se que o tratamento com  $\text{AgNO}_3$  0,1% por 1 hora +  $\text{NaClO}$  0,3% por 20 minutos (T2) foi o mais eficiente deste experimento, sendo utilizado na obtenção de explantes foliares assépticos para as fases seguintes. Este resultado concorda com o obtido por HAN et al. (2000) já citado. Chegou-se a este resultado observando que, embora a porcentagens de contaminação fúngica fosse ligeiramente maior do que em T1 ( $\text{AgNO}_3$  0,1% por 5 min + etOH 70% por 5 min +  $\text{CaClO}$  0,25% por 5 min), os outros três índices eram mais favoráveis do que em outros tratamentos.

Nos tratamentos a base de nitrato de prata, observou-se a presença de necrose nas extremidades dos segmentos nodais. Foram feitos então cortes longitudinais nos segmentos nodais (FIGURA 3) que apresentaram necrose completa, ou nas bordas, e pôde-se perceber que havia penetração de nitrato de prata por meio dos vasos condutores.

TABELA 11 - Efeito dos tratamentos à base se  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CuSO}_4$  sobre as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Tratamento	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Brotação (%)
T1	10,0	46,7	33,3	63,3
T2	13,3	40,0	26,7	73,3
T3	40,0	66,7	73,3	13,3
T4	46,7	56,7	60,0	30,0

Observou-se que os explantes que não sofreram nenhum tipo de contaminação ainda apresentavam necrose em seu ápice e base. Foi observado também que havia um exsudato, o que alterava a cor do meio de cultura deixando-o com uma coloração caramelo. Um estudo mais cuidadoso demonstrou que em 100% destes segmentos nodais oxidados havia necrose no ápice e base. Como o nitrato de prata é um forte oxidante ele poderia ter penetrado pelos vasos condutores causando a necrose destas regiões. Esta dúvida gerou então um experimento (experimento IV) para avaliar o efeito da penetração do nitrato de prata nos vasos condutores dos segmentos nodais isolados.



FIGURA 3 - Corte longitudinal realizado em segmento nodal de *Rosa x hybrida* cv. Vegas demonstrando a penetração de nitrato de prata nos vasos condutores.

#### 4.3.1.4 Experimento IV – Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais na necrose por infiltração de nitrato de prata.

O teste de qui-quadrado, que pode ser visualizado abaixo (TABELA 12), revelou que para este tratamento, somente a variável necrose apresentou relação estatisticamente significativa, a 99% de confiança, com o tratamento aplicado. Este resultado era desejado, pois o objetivo foi analisar o efeito do corte das extremidades sobre o percentual de necrose.

TABELA 12 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento que avaliou o efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas, na necrose por infiltração de nitrato de prata.

Variável	Qui-quadrado	G.L.	Valor de P
Necrose	10,82	1	0,0010**
Brotação	1,21	1	0,2706ns

Pode-se observar na TABELA 13 que as taxas de necrose foram menores em T1 onde foi realizado o corte das extremidades dos segmentos nodais. Por consequência a porcentagem de brotação foi maior neste tratamento. Os demais índices não apresentaram relação com o tratamento realizado. As porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana apresentaram valores próximos entre si e concordantes com o valor obtido no experimento anterior (experimento III), indicando assim que o corte das extremidades não afeta a taxa de contaminação.

TABELA 13 - Efeito do corte das extremidades dos segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas submetidos a processo de assepsia a base de  $\text{AgNO}_3$  sobre a taxa de necrose.

Tratamentos	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Brotação (%)
T0 (sem corte)	12,50	43,75	68,75	57,50
T1 (com corte)	16,25	51,25	46,25	65,00

Tendo a porcentagem de brotação relação direta com a porcentagem de necrose (neste caso 89,93% de correlação com  $P \leq 0,01$ ), pode-se concluir que a superioridade apresentada pelo tratamento T1 seja decorrente da menor mortalidade por necrose.

Cortes longitudinais foram realizados nos segmentos nodais após a avaliação do experimento para verificar de forma visual a infiltração de nitrato de prata pelos vasos condutores. A presença do nitrato de prata pode ser facilmente detectada expondo o corte à luz, o que faz com que o composto oxide e adquira coloração castanha. O tratamento controle, onde não foram cortadas as extremidades, apresentou necrose e no corte mostrou ter havido infiltração de nitrato de prata nos tecidos condutores. Esta infiltração variou de 3 a 4 mm a contar tanto da base quanto ápice do segmento (FIGURA 4-A). Já no tratamento onde foram cortados o ápice e base, a presença do nitrato de prata foi detectada em menor quantidade e apenas muito próximo ao corte (FIGURA 4-B). Este fato é explicado porque ao cortar um segmento nodal lenhoso como é o da roseira, não se tem precisão para retirar exatamente 5 mm, podendo ter restado regiões onde o nitrato penetrou.

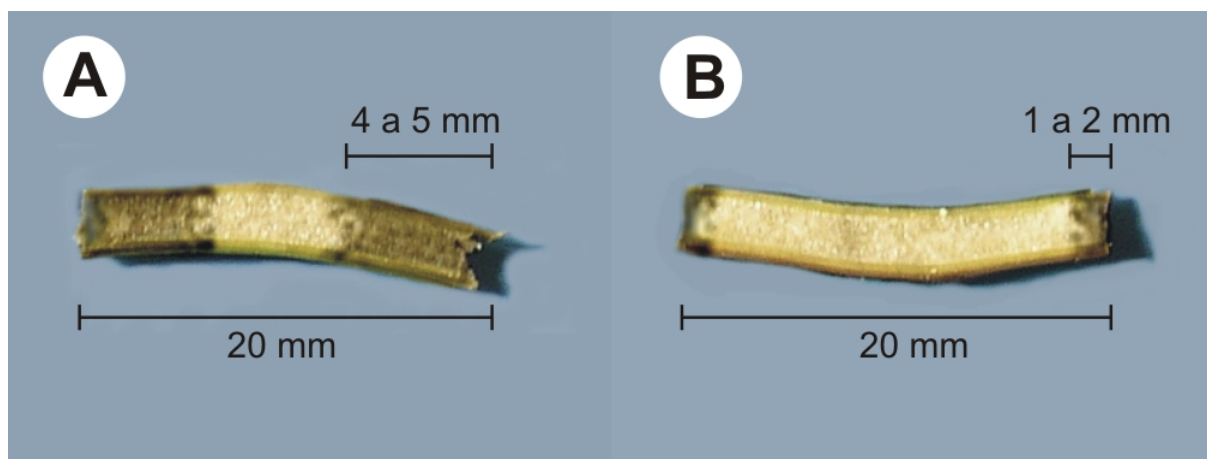


FIGURA 4 - (A) Corte longitudinal em segmento nodal de *Rosa x hybrida* cv. Vegas tratada com  $\text{AgNO}_3$  sem corte das extremidades; (B) Corte longitudinal em segmento nodal de *Rosa x hybrida* cv. Vegas tratada com  $\text{AgNO}_3$  sem corte das extremidades;

Não foram encontrados outros trabalhos confirmando o efeito fitotóxico da penetração do nitrato de prata nos vasos condutores de segmentos nodais. Este tratamento foi eficiente no controle da contaminação fúngica e bacteriana além disso produziu altos índices de brotação se comparado aos demais, porém ainda estava fazendo uso do nitrato de prata. Este agente, além de forte oxidante podendo causar manchas na pele, é tóxico e tem que ser manipulado com muito cuidado. Por este motivo implantou-se o experimento V com digluconato de clorexidina, um agente de menor toxidez.

#### 4.3.1.5 Experimento V – Efeito do digluconato de clorexidina na desinfestação de segmentos nodais.

Pelo teste de qui-quadrado (TABELA 14) observou-se que o comportamento de todas as variáveis medidas, foi resultante do tratamento aplicado, a 99% de confiança. O resultado deste teste pode ser visualizado abaixo.

Para a variável contaminação fúngica os melhores tratamentos foram os tratamentos T11 e T8 que apresentaram apenas 16,67% de explantes com fungos. Pode-se

notar também que o taxa de contaminação diminuiu em função do aumento da concentração e do tempo de exposição.

TABELA 14 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas, tratadas com digluconato de clorexidina.

Variável	Qui-quadrado	G.L.	Valor de P
Fungo	35,83	11	0,0002**
Bactéria	90,42	11	0,0000**
Oxidação	344,03	11	0,0000**
Brotação	334,70	11	0,0000**

TABELA 15 - Efeito do digluconato de clorexidina na assepsia, necrose e formação de brotos em segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

	Tratamentos	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Brotação (%)
T1	0,5% - 5 min	40,00	63,33	10,00	86,67
T2	0,5% - 10 min	36,67	56,67	13,33	70,00
T3	0,5% - 15 min	36,67	46,67	16,67	63,33
T4	1% - 5 min	33,33	46,67	43,33	80,00
T5	1% - 10 min	30,00	50,00	53,33	40,00
T6	1% - 15 min	20,00	43,33	63,33	30,00
T7	2% - 5 min	26,67	33,33	63,33	56,66
T8	2% - 10 min	23,33	43,33	73,33	23,33
T9	2% - 15 min	16,67	23,33	60,00	26,66
T10	4% - 5 min	23,33	30,00	73,33	26,67
T11	4% - 10 min	23,33	26,66	96,67	3,33
T12	4% - 15 min	16,67	16,67	80,00	13,33

Pode-se observar que a contaminação bacteriana, embora fosse mais alta que a contaminação fúngica, foi decrescentes em função da concentração e do tempo de exposição ao produto. Baseando-se apenas na variável contaminação bacteriana, pode-se concluir que o tratamento T12 (4% por 15 min) foi o mais eficiente. Neste tratamento, tanto a contaminação fúngica quanto a bacteriana foram de 16,67%. No cultivo *in vitro* de tecidos vegetais não foi encontrado nenhum outro trabalho utilizando o digluconato de clorexidina. Porém o uso deste produto é extensivo na área médica e odontológica, e nesta área diversos trabalhos foram publicados a respeito do controle microbiano deste agente. Por exemplo, ESTRELA et al. (2003) avaliaram o efeito do digluconato de clorexidina a 2% sobre o crescimento de colônias de bactérias de interesse odontológico (*Streptococcus aureus*, *Escherichia faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*) e obtiveram um controle de 100% para *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *E. faecalis*. BAMBACE (2003) testou o uso do digluconato de clorexidina em solução aquosa nas concentrações de 0,5%, 1%, 2% e 4% para desinfecção de bancadas revestidas com diversos materiais (Aço

inox, couro e fôrmica). O resultado foi uma desinfecção com eficiência de 100% para os patógenos analisados (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Klebsiella pneumoniae*).

O comportamento muda ligeiramente quando se analisa a variável porcentagem de necrose, pois esta aumenta com o aumento da concentração e tempo de exposição. Pode-se notar que as maiores taxas, 96,67 e 80,00% respectivamente, estão associadas aos tratamentos de maior concentração e tempo de exposição. Enquanto que as menores, 10 e 13,33% respectivamente, estão associadas aos tratamentos de menor concentração e tempo de exposição.

Como aconteceu em todos os outros experimentos de assepsia, a variável porcentagem de brotação respondeu inversamente à variável porcentagem de necrose. Sendo que as maiores taxas de brotação, que foram 86,67 e 80%, ocorreram nos tratamentos menos severos (0,5% por 5 minutos e 1% por 5 minutos – respectivamente).

Para uma análise mais detalhada da resposta fornecida pelas variáveis, foi feita então uma análise fatorial com matriz tetracórica. Avaliando todas as variáveis em conjunto tem-se o resultado demonstrado na TABELA 16.

TABELA 16 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina.

	Tratamentos	Escore Fatorial	Ranking
T2	0,5% - 10 min	3,2629	1
T1	0,5% - 5 min	2,4223	2
T4	1% - 5 min	1,7322	3
T5	1% - 10 min	1,3867	4
T3	0,5% - 15 min	0,6723	5
T7	2% - 5 min	-0,3478	6
T6	1% - 15 min	-0,5607	7
T8	2% - 10 min	-0,6036	8
T10	4% - 5 min	-1,2884	9
T9	2% - 15 min	-1,8512	10
T12	4% - 15 min	-2,1338	11
T11	4% - 10 min	-2,6908	12

Pode-se concluir, observando a TABELA 16, que os três tratamentos mais viáveis deste experimento foram os tratamentos com menores tempos e concentrações. São eles:

- T2 – Digluconato de clorexidina a 0,5% por 10 minutos;
- T1 - Digluconato de clorexidina a 0,5% por 5 minutos;

- T4 - Digluconato de clorexidina a 1% por 5 minutos.

#### 4.3.1.6 Experimento VI – Efeito do tratamento com baixa temperatura na porcentagem de oxidação de segmentos nodais

O teste de qui-quadrado resultou em um valor de  $P=0,0000$ , o que indica que os resultados obtidos foram decorrentes dos tratamentos aplicados. Os dados obtidos podem ser vistos na TABELA 17, a partir dos quais pode-se tirar as conclusões a seguir:

TABELA 17 - Efeito combinado do tratamento térmico com posterior tratamento com digluconato de clorexidina por 10 min, nas variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

	Tratamentos	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Brotação (%)
T1	4 dias + 0,5%	16	15	15	75
T2	5 dias + 0,5%	20	40	10	95
T3	6 dias + 0,5%	15	45	15	75
T4	7 dias + 0,5%	20	55	25	60
T5	4 dias + 1%	20	45	20	65
T6	5 dias + 1%	10	20	30	65
T7	6 dias + 1%	25	50	25	60
T8	7 dias + 1%	25	20	30	65
T9	4 dias + 2%	25	25	20	60
T10	5 dias + 2%	25	50	15	70
T11	6 dias + 2%	25	30	30	60
T12	7 dias + 2%	20	25	45	50

Nota-se em todos os casos uma redução na necrose aos 5 dias de exposição à baixa temperatura. Esta redução também está acompanhada do aumento da porcentagem de brotação, que tem seu valor aumentado no quinto dia. O comportamento da porcentagem de necrose tem apresentado, de um modo geral, uma redução do quarto para o quinto dia, voltando a aumentar no sexto e sétimo dia. Comportamento acompanhado inversamente pela porcentagem de brotação.

Para que fosse realizada uma análise mais precisa e não tendenciosa dos valores foi feita uma análise fatorial, para que baseado nos escores fatoriais pudessem ser avaliados os tratamentos. Com base na TABELA 18, pode-se concluir que o tratamento que leva ao melhor resultado, considerando todas as variáveis medidas, é o tratamento T2 onde as hastes florais ficam armazenadas por 5 dias em geladeira a aproximadamente 4°C e por ocasião do isolamento foram tratadas com digluconato de clorexidina a 0,5% durante 10 minutos.

TABELA 18 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de segmentos nodais de *Rosa x hybrida* cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina e submetidos a tratamento térmico.

	Tratamento	Escore Fatorial	Ranking
T2	5 dias + 0,5%	1,6469	1
T1	4 dias + 0,5%	1,3016	2
T3	6 dias + 0,5%	0,7532	3
T6	5 dias + 1%	0,4993	4
T10	5 dias + 2%	-0,0624	5
T5	4 dias + 1%	-0,1171	6
T9	4 dias + 2%	-0,1825	7
T8	7 dias + 1%	-0,2547	8
T11	6 dias + 2%	-0,6675	9
T4	7 dias + 0,5%	-0,7224	10
T7	6 dias + 1%	-0,8740	11
T12	7 dias + 2%	-1,3205	12

Em conclusão, o número de dias em que as hastes são submetidas ao frio influi na taxa de necrose. O melhor resultado foi obtido para a rosa no quinto dia de exposição ao frio independentemente do método de assepsia realizado. Entre os tratamentos realizados, a exposição de 5 dias com assepsia de 0,5% por 10 minutos, se mostrou a mais eficiente em termos de redução da oxidação e aumento da brotação.

Pode-se concluir que de uma maneira geral, os tratamentos de desinfestação realizados ao longo desta fase, apresentaram um grau crescente de eficiência no controle das contaminações. Esta espécie se mostrou sensível às altas concentrações de desinfestantes, bem como a grandes tempos de exposição. Confirmando o que GEORGE (1992) observou, que a concentração e o tempo de exposição aos desinfestantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. A desinfestação eficiente é aquela que elimina os microorganismos sem, no entanto, causar danos ou morte do tecido vegetal. Neste trabalho, o processo de assepsia que apresentou tais características foi o tratamento com digluconato de clorexidina a 0,5% durante 10 minuto, após uma exposição de 5 dias de frio. Concentrações elevadas (2 e 4%) provocaram um aumento na taxa de necrose dos tecidos inviabilizando estas concentrações. Apesar de se obterem resultados satisfatórios com tratamentos a base de nitrato de prata, este produto deve ser evitado pelo seu potencial poluente e pela sua toxidez a seres humanos.



#### 4.3.2 BROTAÇÃO DE HASTES FLORAIS EX VITRO

Realizado o teste de qui-quadrado (TABELA 19) verificou-se que há relação estatística entre o tratamento aplicado e o resultado obtido ( $P \leq 0,01$ ) para todas as variáveis. Com esta informação pode-se seguir com as demais análises.

TABELA 19 - Valores de Qui-quadrado para as variáveis analisadas no experimento de brotação de estacas de *Rosa x hybrida* cv. Vegas, ex vitro.

Variável	Qui-quadrado	G.L.	Valor de P
Fungo	874,20	11	0,0000**
Bactéria	702,63	11	0,0000**
Oxidação	351,16	11	0,0000**

Pode-se observar com base na TABELA 20, que os tratamentos testemunha (sem exposição ao digluconato de clorexidina), apresentaram 100% de contaminação de ambos os tipos, indicando necessidade de assepsia no caso de explantes foliares. Este dado indica que ainda que as hastes tenham sido pré-escovadas e brotadas em sala de crescimento existe a presença de contaminantes. Ainda com base na TABELA 20, podemos concluir que explantes foliares são sensíveis a altas concentrações de digluconato de clorexidina (2 e 4%), que causaram necrose no tecido. A taxa de necrose foi aumentando à medida que aumentou a concentração e o tempo de exposição, mostrando um comportamento linear.

No geral as taxas de contaminação bacteriana e fúngica foram menores do que nos experimentos envolvendo segmentos nodais, indicando menor grau de contaminação com este procedimento.

TABELA 20 - Efeito do digluconato de clorexidina sobre a contaminação e necrose, na assepsia de explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

Tratamento	Fungo%	Bactéria%	Necrose%
T0 Testemunha (água estéril)	100	100	0
T1 0,5% - 2 min	15	25	0
T2 0,5% - 5 min	15	20	0
T3 0,5% - 10 min	0	5	0
T4 1% - 2 min	15	15	30
T5 1% - 5 min	10	15	35
T6 1% - 10 min	10	20	45
T7 2% - 2 min	5	15	35
T8 2% - 5 min	5	15	45
T9 2% - 10 min	5	10	60

Para uma avaliação mais concisa do experimento os dados foram submetidos a uma AFMT para determinar, baseando-se nas três variáveis, quais os melhores tratamentos. O resultado está na TABELA 21.

TABELA 21 - Escores fatoriais obtidos pela análise fatorial por matriz tetracórica das variáveis analisadas no experimento de assepsia de explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas tratados com digluconato de clorexidina.

	Tratamento	Escore Fatorial	Ranking
T3	0,5% - 10 min	1,0854	1
T2	0,5% - 5 min	1,0391	2
T1	0,5% - 2 min	0,8474	3
T4	1% - 2 min	0,8151	4
T5	1% - 5 min	0,7257	5
T7	2% - 2 min	0,5852	6
T6	1% - 10 min	0,5558	7
T8	2% - 5 min	0,3565	8
T9	2% - 10 min	-0,3585	9
T0	Testemunha (água estéril)	-2,4368	10

Com base na análise fatorial (TABELA 21), podemos concluir que os três melhores tratamentos são T3, T2 e T1, nesta ordem, sendo que os três utilizaram uma concentração de 0,5% de clorexidina. O tratamento com o maior grau de eficiência foi o tratamento T3 com 95% de explantes aproveitáveis seguido por T2 com 80%.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Conclui-se por meio dos experimentos realizados que o método de brotação *ex vitro* com posterior assepsia do explante foliar é mais eficiente do que o de brotação de segmentos *in vitro*.

## 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAMBACE, A. M. J., Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies, **Revista da APCD**, v. 49, n. 6, p. 417-427, 2003.
- BERGAMIN, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, São Paulo: Editora Agronômica CERES, v.1, 1995.
- CASTRO, C.E.F.C. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 4, n. 1/2, p.1-46, 1998.
- CASTRO, M. Evaluation of explants disinfection protocols and explants protocols for the use of anti-oxidants in in-vitro cultivation of rose and the quantitative determination of shoot phenolic content. **Acta Horticulturae**, n. 497, p. 303-314, 1999.
- DANTAS, A.C. DE M., PEREIRA, J.E.S., FORTES, G.R. DE L., FORTES, G.R. Descontaminação e efeito do fungicida benomil sobre a multiplicação do porta-enxerto de macieira M.9. **Agropecuária Clima Temperado**. n.3 v.2, p. 245-252, 2000.
- ESTRELA, C. et al. Antimicrobial Effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine Tested by Different Methods, **Brazilian Dentist Journal**, v. 14, n. 1, p. 58-62, 2003.
- FETT W. F.; COOKE P. H. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated alfalfa seed with commercial citrus-related products. **Journal of Food Protection**, v. 66 n. 7, p. 1158-1165, 2003.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. **The Technology**. Edington, v.1, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998, v.1, p. 183-260.
- HAN, Y.H.; CHOI, B.R.; SOH, H.S.; LEE, S.J.; CHOI, Y.J.; KIM, S. In vitro plant regeneration for mass propagation of *Epimedium koreanum* N. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, n. 18:6, p. 834-838, 2000.
- HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, Y.; TONOGAI, Y.; KOBATAKE, M.; ITO, Y. Antimicrobial effect of sodium chlorite on bacteria and yeasts, **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**. v. 30, p. 240-249, 1989.
- IBRAHIM, R., DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida*), **Scientia Horticulturae**, v. 88 p. 41-57, 2001.
- JEHANGIR, K., IHSANUL, H., KHATTAK, M.S., MUKHTAR, A. In vitro bud culture of MM.106 apple rootstock. **Sarhad Journal of Agriculture**, n.14, p. 207-209, 1998.
- KAZEMPOUR, M. N. Epiphytic and endophytic colonization of *Pseudomonas syringae* in tomato. **Agricultural Sciences and Technology**, n. 16, p. 57-66, 2002.

- MEDEIROS C. P. C. DE et al. In vitro culture of nodal explants of hog plum (*Spondias mombin* L.): disinfection stage. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22 n. 1, p. 144-147, 2000.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 3, p. 11-18, 2001.
- PARKINSON, M. et al. Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. Natural Environment Research Council 'Tree Biotechnology Liaison Group'. Proceedings of the 15th annual meeting, 10-12 Abril 1995, Belfast, UK. **Plant Growth Regulation**, n. 20, p. 61-66, 1996.
- PAVINGEROVA, D.; BRIZA, J.; PRENEROVA, E. In vitro propagation of *Rhododendron* spp. from flower buds. **Rostlinna Vyroba**. n. 46, p. 281-283, 2000.
- RAMIREZ DEL CASTILLO, A.; ANGARITA ZERDA, A. Estudios preliminares para la propagacion clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomia Colombiana**, v. 7, n. 1-2, p. 17-25, 1990.
- RAMIREZ V. M. del C.; SALAZAR, Y. E. G. Metodo de desinfeccion y efecto de citocininas en el cultivo in vitro de segmentos de hojas de Psidium guajava L. **Revista de la Facultad de Agronomia de la Universidad de Zulia**, a.15, n. 2, p. 162-173, 1998.
- SALEHI, H. A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, n. 68, p. 145-149, 1997.
- SKIRVIN, R. M.; HALL, H. K.; QUAZI, M. H. Isolation of a pure thornless loganberry by meristem tip culture. **Euphytica**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 1039-1044, 1986.
- TODA, T.; NISHIMURA, K.; YAMATE, H. Tissue culture of *Rhus saccidanea* L. (hazenoki). **Bulletin of the National Forest Tree Breeding Center**, n. 13, p. 53-64, 1995.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais, **Instituto Agrônomo de Campinas – Boletim Técnico**, n. 174, p. 40-45, 1998.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Ed. Embrapa –SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 1998.
- VESCO, L. L. DAL; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Fruticultura**. n. 21, p. 60-64; 1999.
- WILSON, D. In vitro propagation of rose cv. Folklore. **Journal of Tropical Agriculture**, n. 36, p. 12-17, 1998.

## 5 CAPÍTULO IV – Organogênese em Tecido Foliar

### 5.1 INTRODUÇÃO

A organogênese é uma resposta morfogenética que um explante tem a um estímulo hormonal podendo produzir parte aérea, raiz ou embrião. O processo se dá por desdiferenciação de um tecido vegetal, que assume características meristemáticas e posterior diferenciação em tecido especializado (TORRES, 1998). Isto é possível devido à totipotência da célula vegetal, que é a capacidade que uma célula vegetal tem de regenerar o indivíduo completo (HABERLANDT, 1902). Esta habilidade de regenerar plantas completas por meio de tecidos somáticos é pré-requisito para a transformação genética mediada por *Agrobacterium*, um dos mais bem sucedidos métodos de transferência de genes usado na engenharia genética de diversas culturas (DANDEKAR, 1992).

Diversos tipos de explantes podem ser usados para o processo de organogênese *in vitro* de uma espécie, mas para se escolher um bom explante, deve-se levar em conta o grau de diferenciação do tecido que será utilizado e qual a finalidade do processo. Em teoria pode-se usar qualquer tecido ou célula para se obter uma nova planta, mas o grau de diferenciação afeta diretamente o sucesso desta tarefa. Quanto mais tecido jovem e indiferenciado o explante contiver, mais fácil será a tarefa de regenerá-lo (TORRES, 1998). Porém, quando se tem um objetivo específico como a transformação genética, a gama de opções se reduz consideravelmente. Então se deve escolher um explante que seja transformado pelo *Agrobacterium* com relativo sucesso, e ainda tenha um bom potencial de regeneração. Especificamente na cultura de roseiras, dois explantes são os mais utilizados: as folhas e os embriões somáticos (HSIA e KORBAN, 1996). Protocolos de regeneração de plantas via explantes foliares existem para diversos cultivares de *Rosa x hybrida*, porém há uma grande variação nos graus de sucesso quando se tenta adaptar o protocolo de um cultivar para outro. Portanto, para cada cultivar se deve estabelecer um protocolo diferenciado.

O início do processo de desenvolvimento é feito por meio da adaptação de protocolos consolidados para outros cultivares (KHOSH-KHUI e SINK, 1982b, SCHUYLER

S. KORBAN<sup>3</sup>). O processo utilizado pela grande maioria dos autores é a organogênese indireta, na qual o explante passa pelo estágio de calo para só então se rediferenciar em órgãos com função específica, como gemas e raízes.

A primeira etapa do protocolo é conseguir que um tecido diferenciado como a folha, se desdiferencie para formar um calo com potencial regenerativo. HILL (1967) indica que a relação entre auxinas e citocininas apropriada para formação de calo e regeneração de plantas é variável para cada cultivar de rosa. Este mesmo autor conseguiu, em seus experimentos com o cultivar The Doctor, originar calo que regenerasse com sucesso obtendo gemas, porém sem nunca obter plantas completas. O meio de cultura utilizado para tanto foi o MS suplementado com ANA a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, CIN a 0,2 mg.L<sup>-1</sup> e GA<sub>3</sub> a 20 mg.L<sup>-1</sup>. JACOBS et al. (1968) relatam que diferentes concentrações de AIA e CIN combinadas resultam na formação rápida de calos, a partir de explantes foliares do cultivar Super Star; porém, nunca foi obtida a diferenciação de tecidos. DUBOIS e DEVRIES (1995) conseguiram regeneração direta de gemas em explantes foliares obtidos dos cultivares Madelon, Only Love, Presto, Sonia e Tineke em meio MS<sup>1/2</sup> suplementado com 15 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ e 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Corroborando com este resultado está a observação feita por IBRAHIM e DEBERGH (2001) que afirmaram que o TDZ e a CIN são as citocininas mais efetivas na estimulação da produção de gemas adventícias em *Rosaceas*. Estes mesmos autores, adaptando o protocolo de DUBOIS e DEVRIES (1995), usaram o método de regeneração em duas etapas (indução de calo e regeneração) para obter plântulas. Na primeira etapa, para obtenção de calo, foi utilizado com sucesso o meio MS + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 60 mg.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>. Após sete dias de incubação no escuro a 23°C, os calos foram transferidos para meio de regeneração, que consistiam no meio MS + 5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,02 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, obtendo em 8 semanas gemas com formação de primórdios foliares. ARIF e KHATAMIANI (1996), induziram calos em discos foliares de *Rosa x hybrida* cv. Tiffany isolando-os em meio SH (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972) suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D, durante 2 semanas no escuro. Estes calos foram transferidos para o meio MS suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de CIN na presença de luz onde originaram raízes adventícias e gemas em 1 e 6 semanas, respectivamente. HSIA e KORBAN (1996) isolaram folhas do cultivar Carefree Beauty em meio MS suplementado com diversas concentrações de 2,4-D (2,20, 22,10 e 44,20 mg.L<sup>-1</sup>), o que produziu um calo altamente rizogênico. Quando transferidos para meio MS, suplementado com 5 mg.L<sup>-1</sup> de

---

<sup>3</sup> KORBAN, Schuyler S., Departamento de Recursos Naturais e Ciências Ambientais da Universidade de Illinois, informação pessoal, 2003

TDZ + 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> produziram uma baixa taxa de formação de gemas (3,3%). MOHAN e IBRAHIM (2000), em seu experimento com três variedades de rosa (*Rosa sp.* cv. Pink tinge, *Rosa borbanica* cv. Edward e *Rosa centifolia* cv. Andhra Red), testou varias concentrações de 2,4-D (0,1 a 2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e BAP (0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e suas combinações para indução de calos em explantes foliares. O resultado obtido foi que a porcentagem mais alta (25%) de formação de calos foi conseguida com o meio MS suplementado com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

O objetivo desta etapa foi estabelecer um protocolo de organogênese indireta de *Rosa x hybrida* cv. Vegas a partir de explantes foliares assépticos.



## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos desta fase foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR.

Os meios de cultura utilizados para estabelecimento dos processos básicos da organogênese via explante foliar foram: MS, SH e WPM, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, com pH ajustado para 5,8 antes da colocação do agente geleificante.

Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio 25 x 150 mm, contendo cada um 10 mL de meio de cultura e então autoclavados durante 20 minutos a 1,05 kg.cm<sup>-2</sup> de pressão e 121°C. Os tubos foram fechados com tampas plásticas próprias para este fim. Os reguladores GA<sub>3</sub> e AIA, compostos sensíveis à alta temperatura, foram esterilizados por filtração e adicionados, após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar.

Folhas assépticas de *Rosa x hybrida* cultivar Vegas obtidas pelo processo de assepsia *ex vitro*, descrito no capítulo II, foram usadas como fonte de explantes. As folhas compostas foram separadas em folíolos, e cada um dos folíolos foi cortado ao meio em placa-de-petri contendo água estéril para evitar o ressecamento e isolado em câmara de fluxo laminar em meio de cultura MS, suplementado com vários reguladores de crescimento em diferentes combinações e concentrações.

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram incubados em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas do tipo branca fria (fluorescente) de irradiância de 60 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 25 ± 2 °C.

### 5.2.1 INDUÇÃO DE CALO ORGANOGÊNICO

#### 5.2.1.1 Experimento I - Efeito da combinação de vários reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.

As suplementações de reguladores adicionados ao meio MS nesta fase para a indução de calos organogênicos são mostradas a seguir:

- T1 – MS + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN
- T2 – MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>
- T3 – MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP
- T4 – MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>
- T5 – MS + 0,12 mg.L<sup>-1</sup> AIB + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN

Os meios de cultura descritos foram vertidos em placas-de-petri previamente esterilizadas. Um tratamento testemunha não foi incluso neste teste uma vez que se sabe, que calos não são formados em meio MS sem suplementação hormonal. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições e 10 explantes por parcela. Os tratamentos foram avaliados após 20 dias pela porcentagem de explantes com calo, cor e consistência do calo, e porcentagem de explantes com formação de gemas.

### 5.2.2 ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES

Este é um experimento composto de duas etapas, a primeira em que foi induzida a formação de calos e a segunda em que foi induzida a formação de gemas nos calos.

#### 5.2.2.1 Efeito de dois meios de cultura suplementados ou não com reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.

Na primeira etapa foram utilizados dois meios de cultura distintos para a indução de calos organogênicos nos explantes foliares. Foram eles o meio MS e o SH (SCHENK e HILDEBRANDT, 1972), conforme descrito a seguir:

- T0a – SH
- T1a – SH + 3 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D
- T2a – MS + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> AIB + 60 mg.L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>

Todos os explantes foram mantidos no escuro por 10 dias. Após este período, foram transferidos para outro meio de cultura e incubados na presença de luz. Neste caso, o tratamento testemunha foi o meio SH, pois não é conhecido o efeito do meio SH sem suplementação sobre explantes foliares de rosa.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 8 repetições com 10 explantes por repetição. Os tratamentos foram avaliados após 10 dias pela formação, cor e consistência do calo.

#### 5.2.2.2 Efeito de dois meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento na indução de gemas em calos organogênicos.

Os calos provenientes do experimento 5.2.2.1 foram transferidos para estes dois meios de cultura e incubados na presença de luz, depois de passarem 10 dias no escuro. Calos de 2 tratamentos da primeira fase deste experimento (T1 e T2) foram inoculados nos dois meios de cultura descritos abaixo gerando 4 combinações (T1a x T1b; T1a x T2b; T2a x T1b; T2a x T2b).

- T1b – MS + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 20 mg.L<sup>-1</sup> Adenina
- T2b – WPM + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 4 repetições com 10 explantes por parcela. Os tratamentos foram avaliados após 6 semanas pela porcentagem de calos com gemas e porcentagem de calos oxidados.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 INDUÇÃO DE CALO ORGANOGÊNICO

#### 5.3.1.1 Efeito da combinação de vários reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.

Respostas morfogênicas foram observadas desde o décimo quinto dia de cultivo, com o espessamento dos tecidos e a formação de massas celulares nas zonas de presença de tecido de condução (vasos) causando encarquilhamento das folhas em todos os tratamentos (TABELA 22). As massas, após sucessivas divisões, romperam a epiderme foliar expondo o tecido caloso que continuava a se multiplicar até encobrir todo o tecido foliar original.

TABELA 22 - Descrição das variáveis analisadas no experimento de indução de calos organogênicos em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas submetidos a 5 suplementações de reguladores de crescimento do meio MS.

Tratamento	Formação de calo (%)	Cor	Consistência	Formação de gemas (%)
T1	100	Verde claro tendendo ao branco	Friável	0
T2	100	Bege tendendo ao branco	Rígida	0
T3	100	Acinzentado com áreas claras	Rígida	0
T4	100	Verde claro tendendo ao branco	Friável	0
T5	100	Verde claro tendendo ao amarelado	Rígida	0

Os calos do tratamento 1 (MS + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN) apresentaram consistência friável, textura arenosa, de cor verde claro tendendo ao branco com formação ao longo da nervura principal, sem a presença de gemas (FIGURA 5). Este resultado que contraria o sucesso obtido por VOYIATZI et al. (1995) que usaram concentrações de AIA entre 0,3 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> combinadas com diversas citocininas (cinetina inclusive), obtendo gemas em calos de rosa cultivar Dr. Verhage com 6 semanas.



FIGURA 5 - Calo induzido no meio MS + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> AIA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

Os calos formados como resultado do tratamento 2 (MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) apresentaram consistência rígida, de textura arenosa, cor bege claro tendendo ao branco com algumas massas independentes de cor cinza sobre o calo principal. Estas regiões eram rígidas e se desprendiam facilmente do calo principal. A divisão celular para formação da massa iniciou-se na região da nervura principal da folha dividindo-se até cobrir o explante foliar completamente (FIGURA 6). Nenhuma gema foi observada na superfície deste calo. Resultado semelhante foi obtido por JACOBS et al. (1968) que obtiveram calos em *Rosa x hybrida* com a mesma característica usando MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> CIN + 20 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. VALLES e BOXUS (1987) conseguiram regenerar gemas em calos provindos de segmentos nodais de *Rosa x hybrida*, porém com as mesmas características.

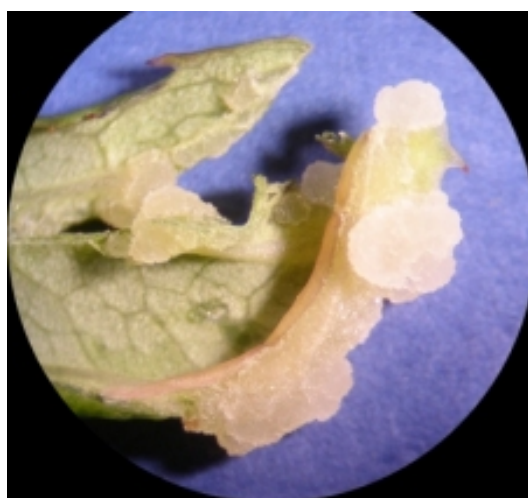


FIGURA 6 - Calo induzido no meio MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

No tratamento 3 (MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP), surgiram calos rígidos de cor acinzentada ao longo de todo o limbo foliar. As células das extremidades eram cristalinas tendendo ao esbranquiçado (FIGURA 7). Não foi detectada a formação de gemas nos calos deste tratamento. Contrário ao resultado obtido neste trabalho está o de LLOYD et al. (1988) que relataram a obtenção de gemas adventícias formadas em calos de um híbrido, de *Rosa persica* x *Rosa xanthina*, em meio MS suplementado com 9,9-19,8 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 1,0-3,0 mg.L<sup>-1</sup> ANA. Os calos de rosa obtidos por LLOYD et al. foram cultivados durante 6 semanas até que apresentassem formação de gemas.

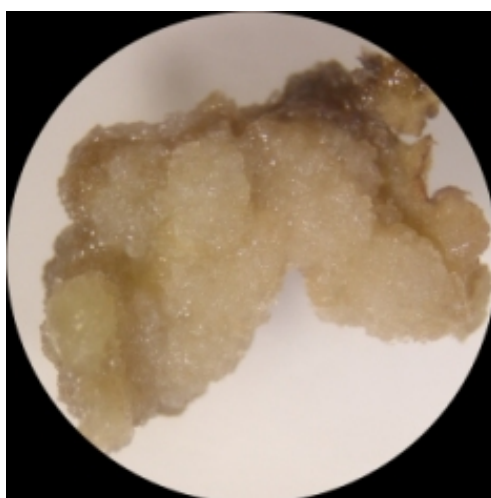


FIGURA 7 - Calo induzido no meio MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

A resposta obtida no tratamento 4 (MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) foi um calo de consistência friável, de textura arenosa e de cor verde claro (FIGURA 8). Não houve formação de gemas na superfície dos calos originados por este tratamento aos 20 dias de cultivo (data estabelecida para avaliação), porém estes calos não foram descartados e foram mantidos em cultivo. Passados 5 meses (de jul/2003 a dez/2003) foi observada uma média de 2 gemas por calo na superfície de 70% destes calos (FIGURA 9). Este resultado era esperado, pois o tratamento foi baseado nos resultados obtidos por ROUT et al. (1992) com segmentos foliares de rosa cultivar Landora em meio MS suplementado com 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 20 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Em 8 semanas (12 a menos) foram obtidas gemas na superfície dos calos. Esta discrepância possivelmente reside na diferença genética entre cultivares.

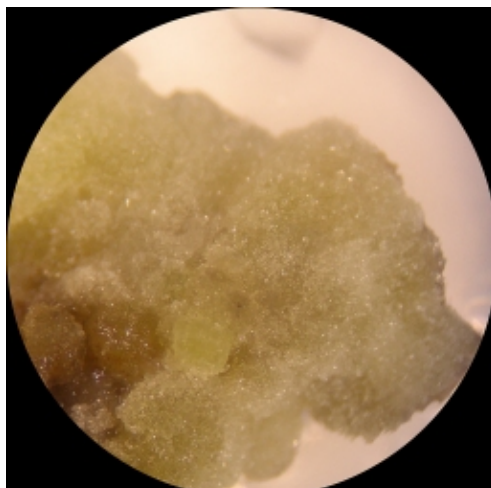


FIGURA 8 - Calo induzido no meio MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas

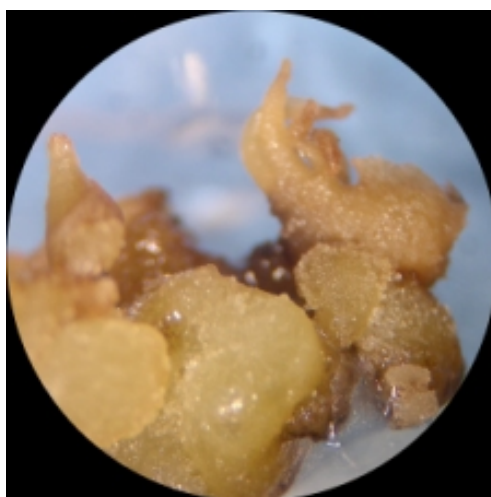


FIGURA 9 - Gemas induzidas em calos de explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas cultivados em meio MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>

Os calos do tratamento 5 (MS + 0,12 mg.L<sup>-1</sup> AIB + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN), apresentaram consistência rígida, cor verde claro tendendo ao amarelado, com textura arenosa. As massas destes calos foram muito superiores em tamanho em comparação aos calos dos outros tratamentos (FIGURA 10). O resultado obtido neste trabalho, está contrapondo o de IBRAHIM e DEBERGH (2001) usando o mesmo meio de cultura e trabalhando com rosas do cultivar Inka conseguiram gerar calos verde claro e friáveis que regeneraram gemas em 6 semanas de cultivo a contar do isolamento.



FIGURA 10 - Calos induzidos no meio MS + 0,12 mg.L<sup>-1</sup> AIB + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> CIN em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

### 5.3.2 ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES

#### 5.3.2.1 Efeito de dois meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento na indução de calos organogênicos em explantes foliares.

Neste experimento, a formação de calos ocorreu nos meios MS suplementado com TDZ e AIB, e SH suplementados com 2,4-D. Não foi observada nenhuma alteração nos explantes isolados em meio SH sem suplementação (TABELA 23). A ANOVA não pode ser realizada para este experimento pois como 100% dos explantes originaram calos, a variância dentro de cada tratamento é zero. Então foi realizado um teste de qui quadrado, que indicou por meio de  $P=0,0001$  que há relação estatística entre o tratamento aplicado e o resultado obtido.

Na testemunha (tratamento 0 – SH sem suplementação), o explante continuou vivo e sem alteração de coloração; porém, não houve nenhuma alteração morfológica visível.

TABELA 23 - Efeito de dois meios de cultura (MS e SH) sobre a formação de calos em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas.

Tratamento	Formação de calo (%)	Cor	Consistência
T0 - SH	0	---	---
T1 - SH + 3 mg.L <sup>-1</sup>	100	Verde escuro	Rígida
T2 - MS + 1,5 mg.L <sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> AIB + 60 mg.L <sup>-1</sup> de AgNO <sub>3</sub>	100	Verde escuro	Friável



No tratamento 1 (SH + 3 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D) houve a formação de calos compactos e de coloração verde escuro, formando-se nas regiões onde o tecido de condução foi ferido. Calos de *Rosa x hybrida* com esta característica também foram obtidos por ARIF (1996).

No tratamento 2 (MS + 1,5 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> AIB + 60 mg.L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>) houve a formação de calos friáveis, de cor verde escuro iniciados nas regiões onde os tecidos vasculares foram cortados. As regiões onde não houve formação de calo (parênquima do limbo foliar) foram oxidadas pelo nitrato de prata tornando-se escuras, porém sem alteração da cor dos calos. O resultado deste trabalho corrobora o que foi obtido por IBRAHIM e DEBERGH (2001) usando o mesmo meio de cultura com explantes foliares dos genótipos RUI 317 e RUI 319 de *Rosa x hybrida* melhorada.

Os calos originados dos dois tratamentos foram transferidos para os meios de indução de gemas.

#### 5.3.2.2 Efeito de dois meios de cultura suplementados ou não com reguladores de crescimento na indução de gemas em calos organogênicos.

A primeira combinação (T1a x T1b), que foi desenvolvida por ARIF (1996) para *Rosa x hybrida*, permitiu a formação de calos, porém o mesmo não pode ser dito da formação de gemas. Os calos foram mantidos além do período de avaliação (6 semanas) e ainda assim não apresentaram nenhum sinal visível de formação de gemas, contrariando o resultado de ARIF (1996) que obteve gemas em calos de *Rosa x hybrida* cultivar 'Tiffany' às 6 semanas de cultivo. A combinação desenvolvida por IBRAHIM e DEBERGH (2001) (T2a x T2b), também não deu resultados positivos para a formação de gemas. Os calos não apresentaram nenhum sinal visível de formação de gemas em sua superfície. IBRAHIM e DEBERGH (2001) obtiveram gemas em calos induzidos em explantes foliares dos genótipos RUI 317 e RUI 319.

A mescla entre os protocolos desenvolvidos pelos dois autores (combinações T1a x T2b e T2a x T1b), assim como as duas primeiras combinações, não originaram gemas visíveis na superfície dos calos, inviabilizando estes protocolos para indução de gemas via explante foliar para o cultivar Vegas.

## 5.4 CONCLUSÃO

A indução de calos e posteriormente de gemas adventícias em explantes foliares de *Rosa x hybrida* cv. Vegas pode ser obtida pela cultura dos explantes em meio MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. O tempo estimado é de aproximadamente 5 meses por este método e o rendimento médio é de 2 gemas adventícias por calo.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIF, M.B.; KHATAMIAN, H. In vitro morphogenesis from callus of *Rosa hybrida*. **PGRSA-Quarterly**, v.24, p. 104-110, 1996.
- DANDEKAR, A.M. - Transformation. In: Hammerschlag, F.A., Litz, R.E. (Eds.), **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. CAB International, Wallingford, UK, p. 141-168, 1992.
- DUBOIS, L.A.M.; DE VRIES, D.P. Preliminary report on the direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of in vitro grown glass house rose cultivars, **Gartenbauwissenschaft**, v.60, p. 249-253, 1995.
- HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsberichte Mathematisch Naturwissenschaftlichen Klasse der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu Muenchen Wien**, v.111, p. 69-92, 1902.
- HILL, G.P. Morphogenesis of shoot primordia in cultivated stem tissue of a Garden Rose. **Nature** 216, 596-597, 1967.
- HSIA, C.N.; KORBAN, S.S., Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.44, p.1-6, 1996.
- IBRAHIM, R.; DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida*), **Scientia Horticulturae**, v. 88 p. 41-57, 2001.
- JACOBS, G.; BORNMAN, C.H.; ALLAN, P. Tissue culture studies on rose: Use of leaf explants. **South African Journal of Agricultural Science**, v.11, p. 673-678, 1968.
- KHOSH-KHUI, M., SINK, K.C. Callus induction and culture of Rosa, **Scientia Horticulturae**, n. 17, p. 361-370, 1982.
- LLOYD, D., ROBERTS, A.V., SHORT, K.C., The induction in vitro of adventitious shoots in Rosa. **Euphytica**, n. 37, p. 31-36, 1998.
- MOHAN, M.M.; IBRAHIM, S.M., Callus induction from leaf bit explants of rose. **Research on Crops**, v. 1, p. 71-73, 2000.
- ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., DAS, P.,. Chloropromazine induced in vitro bud break in *Rosa hybrida* cv, Landora. **Orissa Journal of Horticulture**. n. 20, p. 8-16, 1992.
- SCHENK, R.V., HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, n. 50, p. 199-204, 1972.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Ed. Embrapa –SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, 1998.

- VALLES, M.; BOXUS, P. Micropropagation of 'Forever Yours' rose. **Horticultural Science**, n. 14, p. 611-617, 1987.
- VOYIATZI, C., VOYIATZI, D.G., TSIKMAKI, V. In vitro shoot proliferation rates of the rose cv.(*Hybrid Tea*) 'Dr. Verhage', as affected by apical dominance regulating substances. **Scientia Horticulturae**, n. 61, p. 241-249, 1995.

## 6 Conclusão geral

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que o melhor protocolo alcançado para micropropagação de rosa (*Rosa x hybrida*) cv. Vegas por meio de gemas axilares é o seguinte:

- Assepsia de segmentos nodais por imersão em digluconato de clorexidina a 0,5% por 10 minutos;
- Cultivo inicial para promoção do desenvolvimento, com meio MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> AIA;
- Multiplicação em meio de cultura MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>;
- Enraizamento *in vitro* em meio MS<sup>1/2</sup> sem a necessidade de reguladores de crescimento.

No desenvolvimento do protocolo para obtenção de explantes foliares assépticos os melhores resultados foram obtidos pelo seguinte processo:

- Pré-assepsia das hastes florais por escovação com digluconato de clorexidina a 0,5% com posterior enxágüe;
- Acondicionamento das hastes em sala de crescimento para emissão de brotações;
- Assepsia das brotações com digluconato de clorexidina a 0,5% por 10 minutos para retirada de explante foliar asséptico.

Para indução de calo organogênico, o melhor protocolo obtido foi o seguinte:

- Cultura do explante foliar em meio MS + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 10 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> por 5 meses.

## 7 Sugestões para pesquisas futuras

Partindo dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir algumas pesquisas futuras. No cultivo de gemas axilares, pode-se buscar uma forma eficiente para a aclimação das plântulas enraizadas *in vitro* por meio de experimentos utilizando diferentes substratos, em casa de vegetação sob nebulização intermitente.

Em assepsia podem ser utilizados os resultados dos experimentos com segmentos nodais para auxiliar em outras pesquisas envolvendo explantes com características semelhantes. Ainda pode-se realizar experimentos combinando as substâncias de efeito bactericida com as de efeito fungicida mais eficientes. Os tratamentos que obtiveram um grau satisfatório de sucesso podem ainda ser otimizados alterando-se a concentração e o tempo de exposição.

Com relação aos experimentos de organogênese em tecido foliar, pode-se sugerir que o protocolo seja otimizado para reduzir o tempo de resposta, tentando outros estágios de desenvolvimento do explante utilizado. Variações das concentrações dos reguladores de crescimento também devem ser analisadas. Utilizando outro tipo de citocinina no processo pode-se produzir melhores resultados. Experimentos destinados desenvolver, multiplicar e enraizar estas brotações adventícias ainda devem ser desenvolvidos.

## ANEXOS

### ANEXO I - Composição do meio de cultura MS de MURASHIGE E SKOOG, 1962.

Sais	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	332,000
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,800
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
KI	0,830
KNO <sub>3</sub>	1900,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	180,700
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	16,900
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250
NaEDTA	37,200
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600
Vitaminas	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Ácido Nicotínico	0,500
Glicina	0,500
Inositol	100,000
Piridoxina.HCl	0,050
Tiamina.HCl	0,500

### ANEXO II - Composição do meio de cultura de PIERIK, 1976.

Sais	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
6-benzilaminopurina	1,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,000
KNO <sub>3</sub>	950,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,000

## ANEXO III - Composição do meio de cultura SH de SHENK e HILDEBRANDT, 1996.

Sais	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	151,00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,20
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,865
KI	1,00
KNO <sub>3</sub>	2500,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	195,40
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10
NaEDTA	20,00
NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	300,00
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00

20 g.L<sup>-1</sup> de Sacarose

pH Ajustado para 4,2 antes da adição do agente geleificante

## ANEXO IV - Composição do meio WPM de LLOYD e McCOWN, 1981.

Sais	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96,000
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,250
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,800
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,000
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,300
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250
NaEDTA	37,200
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,000
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600

20 g.L<sup>-1</sup> de Sacarose

pH Ajustado para 5,8 antes da adição do agente geleificante

## ANEXO V - Composição da Calda Bordaleza

- 200 gr de Sulfato de Cobre
- 200 gr de Cal virgem
- 20 L de Água

Misturar bem e depois coar com um saco de tecido